برآورد تنوع ژنتیکی و نرخ درون‌آمیزی در خرس‌های قهوه‌ای زاگرس بر اساس نشانگرهای ریزماهواره

محمدرضا اشرف‌زاده[۱]، محمد کابلی[۲*]

۱. گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد

۲. گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

Email: mkaboli@ut.ac.ir

چکیده

مدیریت و حفاظت از حیات وحش نیازمند داشتن تصویری جامع از تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی در ساختارهای گیتاشناختی است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تنوع ژنتیکی و درون‌آمیزی در خرس‌های قهوه‌ای زاگرس با استفاده از ۱۵ نشانگر ریزماهواره است. تمامی نشانگرهای مورد مطالعه از تعادل هاردی- وینبرگ تبعیت می‌کنند. پس از اجرای آزمون بونفرونی تصحیح شده، در هیچ کدام از مقایسه‌ها، پیوستگی نامتوازن بین لوکوس‌ها مشاهده نشد. تعداد کلی الل‌ها در لوکوس‌های مورد بررسی بین ۷ الل تا ۱۱ الل متغیر بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در خرس‌های قهوه‌ای زاگرس در حدود ۰/۹۴ و ۰/۸۸ برآورد شد. ارزش‌های هتروزیگوسیتی برآورد شده در این پژوهش در میان بالاترین ارزش‌های گزارش شده برای خرس‌های قهوه‌ای که در روسیه، رومانی و اروپای شمالی ثبت شده است قرار می‌گیرد. برآورد شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) بر اساس روش‌های ویر- کوکرهام و رابرتسون-هیل نرخ کمی را برای درون‌آمیزی در داخل خرس‌های قهوه‌ای زاگرس نشان داد.

کلیدواژه‌ها: تغییرپذیری ژنتیکی، هتروزیگوسیتی، درون‌آمیزی، خرس قهوه‌ای.

مقدمه

مدیریت و حفاظت از حیات وحش نیازمند داشتن تصویری جامع از تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی در ساختارهای گیتاشناختی است. تغییرپذیری ژنتیکی یک گونه و جمعیت‌های آن نقشی اساسی در ارزیابی زیستایی و بقای طولانی مدت آن بازی می‌کند (Lacy, 1997). تعیین و درک این مکانیزم‌های ژنتیکی موثر بر جمعیت‌ها، بخش عمده‌ای از پژوهش‌های ژنتیکی و حفاظت را به خود اختصاص می‌دهد. در حال حاضر، ژنتیک حفاظت و بوم‌شناسی مولکولی زمینه‌های کلیدی در پژوهش‌های حیات وحش هستند (Kopatz, 2014). ژنتیک حفاظت از تئوری‌ها و فنون بوم‌شناسی مولکولی، ژنتیک جمعیت و سایر موارد برای بررسی درون‌آمیزی، تنوع ژنتیکی، ساختارهای جمعیت و پیوستگی بین جمعیت‌ها به علاوه عدم قطعیت‌های آرایه شناختی استفاده می‌کند (Frankham et al., 2010).

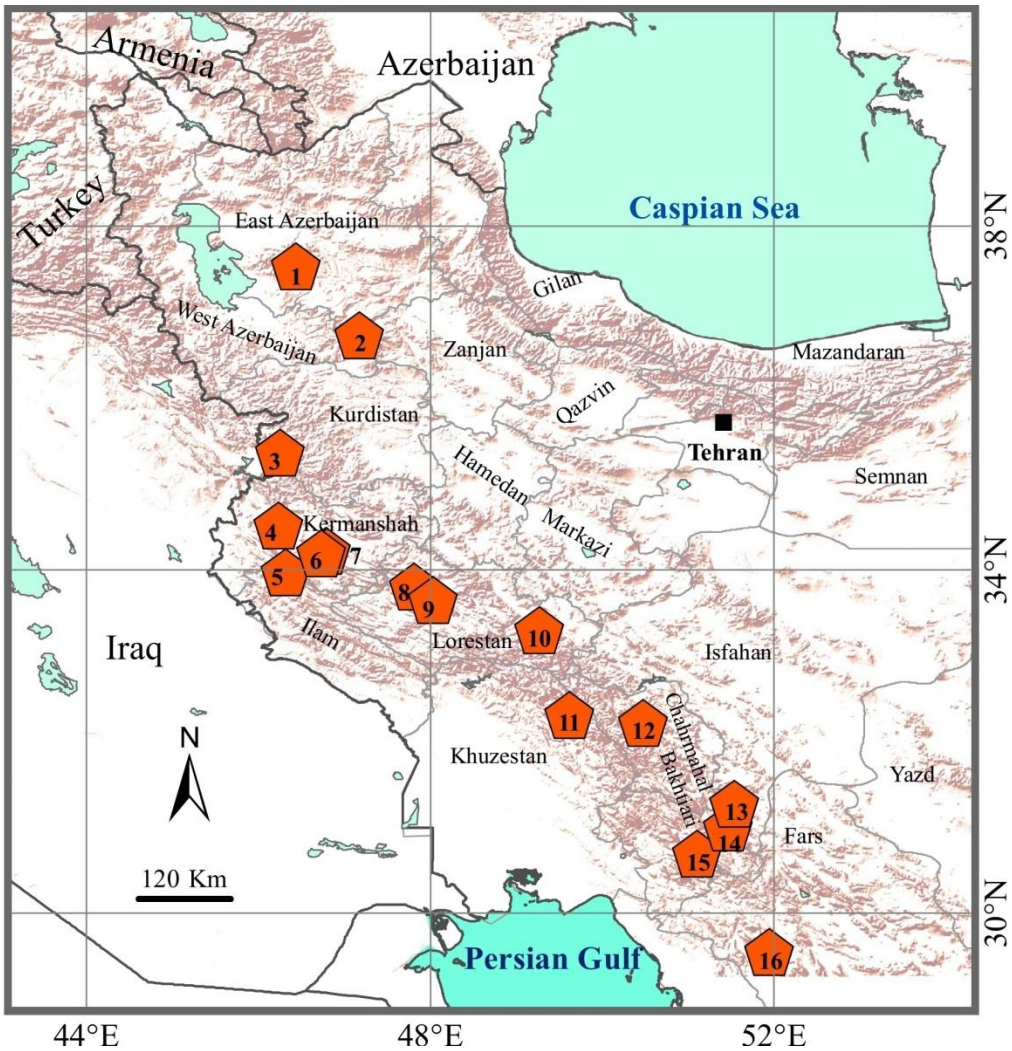
میزان گوناگونی ژنتیکی در یک جمعیت اطلاعات سودمندی را در زمینه ویژگی‌های جمعیت‌شناختی و تاریخچه آن جمعیت فراهم می‌سازد. تنوع ژنتیکی پایین می‌تواند به یک روند کاهش تعداد افراد در گذشته، مانند یک گردنه بطری ژنتیکی، اشاره داشته باشد (Laikre et al., 2009). تنوع ژنتیکی به تعداد افراد در یک گروه یا جمعیت و مقدار جریان ژنی از دیگر جمعیت‌ها به علاوه انتخاب طبیعی در طول زمان وابسته است (Frankham, 1996). درون‌آمیزی، اغلب از پیامدهای اندازه کوچک جمعیت محسوب می‌شود. به دلیل رانش ژنتیکی، به ویژه هنگامی که یک جمعیت جدا افتاده باشد، اختلاف ژنتیکی در طول نسل‌های بعدی از دست خواهد رفت و سرانجام باعث یکسان‌سازی افراد خواهد شد (Allendorf et al., 2013). هم‌آمیزی افراد خویشاوند، سطح هموزیگوسیتی را افزایش داده و سبب بروز الل های کشنده می‌شود. از آنجایی که انتظار می‌رود درون‌آمیزی سطح شایستگی افراد را کاهش دهد، بنابراین یک تهدید عمده برای بسیاری از جمعیت‌های کوچک و در خطر انقراض به شمار می‌رود (Keller and Waller, 2002).

نشانگرهای ژنتیک مولکولی رویکردهای قدرتمندی را در شناسایی فرایندهای تاریخی و معاصر موثر بر تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت در آرایه‌های مختلف ارائه می‌دهند (Neubaum et al., 2007). ریزماهواره‌ها با واحدهای تکراری یک تا هفت جفت نوکلئوتیدی، درجه بالایی از چندریختی را نشان می‌دهند (Jobling et al., 2014). در حال حاضر، استفاده از نشانگرهای هسته‌ای مانند ریزماهواره‌ها جایگاه برجسته‌ای در پژوهش‌های مرتبط با ساختار جمعیت، تبارگیتاشناسی و پایش حیات وحش دارد (Cahill et al., 2013؛ Kopatz et al., 2014). در پژوهش حاضر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره برآوردی از تنوع ژنتیکی و درون‌آمیزی در خرس‌های قهوه‌ای زاگرس به دست خواهد آمد.

مواد و روش‌ها

محدوده مورد مطالعه، در برگیرنده گستره زیستگاه‌های خرس قهوه‌ای در کوه‌های زاگرس است (شکل ۱). برای استخراج دی‌ان‌ای (۱۶ نمونه) از کیت مخصوص استخراج دی‌ان‌ای از بافت ساخت شرکت‌های کیاژن و بیونیر و با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در این پژوهش، تعداد ۱۵ نشانگر ریزماهواره (دی‌نوکلئوتید) شامل G1A،

G1D، G10B، G10L، MU05، MU09، MU10، MU15، MU23، MU50، G10C، G10J، G10M، G10O و Cxx20 (Jackson et al., 2008؛ Murtskhvaladze et al., 2010؛ Andreassen et al., 2012؛ Kopatz et al. 2012؛ Kopatz et al., 2014) استفاده شد.



شکل ۱. موقعیت گیتاشناختی نمونه‌های خرس قهوه‌ای استفاده شده در تحلیل‌ها.

ترکیب مواد استفاده شده در واکنش PCR با حجم ۱۵ میکرولیتر و شامل 10x PCR Buffer ۱/۵µl، MgCl2 ۱/۵mm، U Taq DNA polymerase ۰/۵، mm ۰/۲ از هر dNTP، ۰/۱۶µm آغازگر برگشت، ۰/۰۶۴µm آغازگر رفت و m ۰/۱۲µM13 است. به منظور دست‌یابی به دمای بهینه در تکثیر توالی‌های مورد نظر برای هر کدام از ریزماهواره‌ها از یک برنامه تغییر تدریجی دما (حداقل هشت دمای مختلف در گستره‌ای از ۴۸ تا ۶۶ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ۳۵ چرخه با واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد در پنج دقیقه، واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دماهای ۵۳ تا ۶۲/۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش زنجیره در ۷۲ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مدت پنج دقیقه اجرا شد. تحلیل قطعه (Fragment Analysis) با استفاده از ABI3730xl انجام شد. در نهایت، اندازه قطعه‌های تکثیر شده با استفاده از نرم افزار Geneious R9 (9.0.5; Biomatters Ltd.) تعیین شد.

آزمون‌های تعادل هاردی-وینبرگ و پیوستگی نامتوازن با استفاده از برنامه Genepop 4.2 اجرا شدند (Raymond and Rousset, 1995). احتمال وجود الل‌های نول، خطاهای ایجاد شده به واسطه استاترینگ و دراپ اوت آلل‌های بزرگ با استفاده از نرم‌افزار MicroCheker 2.2.3 آزمون شدند (Van Oosterhout et al., 2004). نرم افزار Arlequin 3.5.2.2 برای ارزیابی تعداد الل (N_a)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) استفاده شد. شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) با کمک نرم‌افزار Genepop و بر اساس روش‌های ویر-کوکرهام و رابرتسون- هیل محاسبه شد.

نتایج

بر اساس تحلیل‌ها، هیچ الل نول، خطای ایجاد شده به واسطه استاترینگ و دراپ اوت آلل‌های بزرگ مشاهده نشد. تمامی نشانگرهای مورد مطالعه از تعادل هاردی- وینبرگ تبعیت می‌کنند. علاوه بر این، بر اساس نتایج حاصل از آزمون کلی (G-test)، هیچ کدام از نشانگرها انحراف معنی‌داری را از هاردی- وینبرگ نشان ندادند. در کمتر از ۱۰ درصد مقایسه زوجی بین لوکوس‌های مختلف پیوستگی نامتوازن مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). در ادامه، با اجرای آزمون بونفرونی تصحیح شده، در هیچ کدام از مقایسه‌ها، پیوستگی نامتوازن بین لوکوس‌ها مشاهده نشد.

تمامی لوکوس‌های مورد بررسی دارای چندریختی بودند. تعداد کلی الل‌ها در این لوکوس‌ها بین ۷ الل تا ۱۱ الل متغیر بود. در جدول ۱ تعداد الل‌ها در هر لوکوس (N_a)، گستره اندازه باندها، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) و هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) آورده شده است. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در خرس‌های قهوه‌ای زاگرس در حدود ۰/۹۴ و ۰/۸۸ برآورد شد.

برآورد شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) بر اساس روش‌های ویر-کوکرهام و رابرتسون-هیل نشان داد که میزان درون‌آمیزی بر اساس هر دو روش مورد مطالعه در داخل خرس‌های قهوه‌ای زاگرس کم است (جدول ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

تمامی لوکوس‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ تبعیت می‌کنند. پس از اجرای آزمون بونفرونی تصحیح شده، در هیچ کدام از مقایسه‌ها، پیوستگی نامتوازن بین لوکوس‌ها مشاهده نشد. در مقایسه با سایر جمعیت‌های خرس قهوه‌ای در اوراسیا و آمریکای شمالی، خرس‌های قهوه‌ای زاگرس همانند خرس‌های اروپای شمالی ارزش‌های زیادی را برای آماره‌های هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده نشان دادند (Kopatz, 2014؛ Støen et al., 2006). ارزش‌های برآورد شده در این پژوهش در میان بالاترین ارزش‌های گزارش شده برای خرس‌های قهوه‌ای که در روسیه، رومانی و اروپای شمالی

ثبت شده است قرار می‌گیرد (Tammeleht et al., 2010؛ Kopatz, 2014). در یک پژوهش میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده برای خرس‌های ساکن شمال غربی اروپا بین ۰/۷۶ و ۰/۸۱ گزارش شده است (Kopatz et al., 2012).

جدول ۱. تنوع ژنتیکی در خرس های قهوه‌ای زاگرس بر اساس ۱۵ نشانگر ریزماهواره

نشانگر	اندازه باند	N_a	H_O	H_e
G1A	۱۷۳-۲۱۱	۷	۰/۸۰	۰/۸۵
G10L	۱۶۸-۲۲۰	۸	۰/۹۶	۰/۸۵
MU05	۱۱۵-۱۴۷	۱۰	۰/۹۱	۰/۸۹
MU09	۱۰۶-۱۳۸	۹	۰/۹۲	۰/۸۹
MU10	۱۳۵-۱۶۵	۸	۰/۹۱	۰/۸۸
MU23	۱۵۶-۱۹۶	۹	۰/۸۳	۰/۸۷
MU50	۱۰۸-۱۴۶	۸	۱/۰۰	۰/۸۶
G10B	۹۲-۱۳۸	۱۰	۰/۹۰	۰/۹۰
G1D	۱۲۳-۱۵۱	۹	۱/۰۰	۰/۸۸
MU15	۱۰۶-۱۴۰	۱۱	۱/۰۰	۰/۹۲
G10C	۹۷-۱۲۳	۸	۰/۹۴	۰/۸۵
G10J	۸۶-۱۱۲	۷	۰/۹۶	۰/۸۵
G10M	۱۸۴-۲۳۰	۹	۰/۹۱	۰/۹۱
G10O	۱۹۸-۲۴۲	۸	۰/۹۴	۰/۸۸
CXX20	۱۲۴-۱۶۲	۱۰	۰/۹۱	۰/۹۱
میانگین		۸/۷۳	۰/۹۴	۰/۸۸

ازنظر تعداد آلل‌ها به ازای هر لوکوس نیز نتایج مشابهی با خرس‌های اروپای شمالی به دست آمد. تعداد آلل‌های به ازای هر لوکوس در خرس‌های قهوه‌ای کرواسی بین پنج تا ۱۰ برآورد شده است (Kocijan et al., 2010). همچنین، تعداد آلل‌ها به ازای هر لوکوس در خرس های شمال غربی اروپا بین پنج تا ۱۵ گزارش شده است (Kopatz et al., 2012).

تنوع ژنتیکی موجود در یک جمعیت به عنوان تابعی از اندازه جمعیت موثر (N_e) در نظر گرفته می‌شود، در حالی که برآورد مستقیم آماره اندازه جمعیت موثر با مشکلاتی روبرو است (Paetkau et al., 1998). درون‌آمیزی به معنی جفت‌گیری خویشاوندان نزدیک به یکدیگر است که این امر منجر به افزایش هموزیگوسیتی می‌شود (Keller and Waller, 2002). بر اساس برآورد شاخص F_{IS}، نرخ‌های کم درون‌آمیزی در خرس‌های زاگرس محاسبه شد. ارزش کلی شاخص F_{IS} برای خرس‌های کرواسی در حدود ۰/۰۱۵ ثبت شده است (Kocijan et al., 2010). ارزش F_{IS} برای خرس-

های ساکن شمال غربی اروپا بین ۰/۰۰۲ تا ۰/۲۶۴ گزارش شده است (Kopatz et al., 2012). در مجموع، خرس‌های قهوه‌ای زاگرس تنوع ژنتیکی بالایی را در مقایسه با سایر خرس‌های قهوه‌ای جهان نشان می‌دهند.

جدول۲. شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) برای لوکوس‌های مختلف در خرس های زاگرس.

نشانگر	ویر-کوکرهام	رابرتسون- هیل
G1A	۰/۰۵۸۸	۰/۰۲۰۴
G10L	-۰/۰۸۰۴	-۰/۰۲۹۲
MU05	-۰/۱۲۶۴	-۰/۰۷۴۱
MU09	-۰/۰۳۹۷	-۰/۰۳۶۵
MU10	-۰/۰۴۳۱	-۰/۰۴۴۲
MU23	۰/۰۰۱۹	۰/۰۳۹۳
MU50	-۰/۱۷۷۴	-۰/۱۰۷۱
G10B	-۰/۰۱۵۲	-۰/۰۲۷۸
G1D	-۰/۱۴۷۱	-۰/۰۸۸۵
MU15	-۰/۰۹۰۹	-۰/۰۵۹۱
G10C	-۰/۱۸۹۲	-۰/۱۰۳۹
G10J	-۰/۱۸۱۸	-۰/۱۳۱۹
G10M	-۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۶۲
G10O	-۰/۱۴۷۸	-۰/۱۰۳۹
CXX20	۰/۰۰۰۰	-۰/۰۲۰۰

سپاسگزاری:

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه کارشناسان محترم آزمایشگاه مرکزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران مهندس کاوه خسرویانی و دکتر ندا قوتی سپاسگزاری نمایند. همچنین از همکاری ارزشمند کارشناسان دفتر موزه تاریخ طبیعی و ذخائر ژنتیکی سازمان حفاظت محیط زیست به ویژه مهندس حبیبا.. حقی، مهندس راضیه محمدی و مهندس زینب فتح‌اللهزاده قدردانی می‌شود. این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) و همچنین همکاری سازمان حفاظت محیط زیست به انجام رسیده است که مراتب سپاس و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع:

1- Allendorf, F.W., Luikart, G. and Aitken, S.N. 2013. Conservation and the Genetics of Populations. Chichester, UK, Wiley-Blackwell.

2- Andreassen, R., Schregel, J., Kopatz, A., Tobiassen, C., Knappskog, P.M., Hagen, S.B., Kleven, O., Schneider, M., Kojola, I., Aspi, J., Rykov, A., Tirronen, K.F., Danilov, P.I. and Eiken, H.G. 2012. A forensic DNA profiling system for Northern European brown bears (*Ursus arctos*). Forensic Science International: Genetics, 6: 798–809.

3- Cahill, J.A., Green, R.E., Fulton, T.L., Stiller, M., Jay, F., Ovsyanikov, N., Salamzade, R., John, J. St., Stirling, J., Slatkin, M. and Shapiro, B. 2013. Genomic Evidence for Island Population Conversion Resolves Conflicting Theories of Polar Bear Evolution. PLoS Genet 9(3): e1003345. doi:10.1371/journal.pgen.1003345.

4- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. Conservation Biology, 10: 1500–1508.

5- Frankham, R., Ballou, J.D. and Briscoe, D.A. 2010. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge, Cambridge University Press.

6- Jakson, J.V., Talbot, S.L. and Farley, S. 2008. Genetic characterization of Kenai brown bears (*Ursus arctos*): microsatellite and mitochondrial DNA control region variation in brown bears of the Kenai Peninsula, south central Alaska. Canadian Journal of Zoology, 86: 756-764.

7- Jobling, M.A., Hollox, E., Hurles, M., Kivisild, T. and Tyler-Smith, C. 2014. Human evolutionary genetics. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC.

8- Keller, L.F. and Waller, D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. Trends in Ecology and Evolution, 17: 230–241.

9- Kocijan, I., Galov, A., Cetkovic, H., Kusak, J., Gomercic, T. and Huber, D. 2011. Genetic diversity of Dinaric brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia with implications for bear conservation in Europe. Mammalian Biology. doi: 10.1016/ j.mambio.2010.12.003.

10- Kopatz, A. 2014. Genetic structure of the brown bears (*Ursus arctos*) in Northern Europe. PhD thesis. Department of Biology, Faculty of Science, University of Oulu, Norway.

Kopatz, A., Eiken, H.G., Hagen, S.B., et al. 2012. Connectivity and population subdivision at the fringe of a large brown bear (*Ursus arctos*) population in North Western Europe. Conservation Genetics, 13: 681–692.

11- Kopatz, A., Eiken, H.G., Aspi, J., Kojola, I., Tobiassen, C., Tirronen, K.F., Danilov, P.I. and Hagen, S.B. 2014. Admixture and Gene Flow from Russia in the Recovering Northern European Brown Bear (*Ursus arctos*). PLoS ONE, 9 (5): e97558. doi:10.1371/journal.pone.0097558.

12- Lacy, R.C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. Journal of Mammalogy, 78: 320–335.

13- Laikre, L., Nilsson. T., Primmer. C.R., Ryman, N. and Allendorf, F.W. 2009. Importance of genetics in the interpretation of favourable conservation status. Conservation Biology, 23: 1378–1381.

14- Murtskhvaladze, M., Gavashelishvili, A. and Tarkhnishvili, D. 2010. Geographic and genetic boundaries of brown bear (*Ursus arctos*) population in the Caucasus. Molecular Ecology, 19: 1829-1841.

15- Neubaum, M.A., Douglas, M.R., Douglas, M.E. and Shea, T.J. 2007. Molecular ecology of the big brown bat (*Eptesicus fuscus*): genetic and natural history variation in a hybrid zone. Journal of Mammalogy, 88: 1230–1238.

16- Paetkau, D., Waits, L.P., Clarkson, P.L., et al. 1998. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. Conservation Biology, 12: 418–429.

17- Støen, O.-G., Zedrosser, A., Sæbø, S. and Swenson, J.E. 2006. Inversely density dependent natal dispersal in brown bears. Oecologia, 148: 356–364.

18- Tammeleht, E., Remm, J., Korsten, M., Davison, J., Tumanov, I., et al. 2010. Genetic structure in large, continuous mammal populations: the example of brown bears in northwestern Eurasia. Molecular Ecology, 19: 5359–5370.