جایگاه تبارشناختی و تنوع ژنتیکی خرس‌های قهوه‌ای ایران (*Ursus arctos*) براساس ناحیه کنترل میتوکندری

- **محمدرضا اشرف‌زاده:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، شهرکرد، صندوق پستی: **1983969411**
- **محمد کابلی*:** گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی: **4111**
- **محمدعلی ادیبی:** اداره کل حفاظت محیط زیست استان سمنان
- **امید یوسفی:** اداره کل حفاظت محیط زیست استان آذربایجان‌غربی، ارومیه
- **محسن امیری:** اداره کل حفاظت محیط زیست استان ارستان، خرم‌آباد
- **محمدرضا مسعود:** اداره کل حفاظت محیط زیست استان آذربایجان‌شرقی، تبریز

تاریخ دریافت: مرداد 1395 تاریخ پذیرش: آبان 1396

چکیده

خرس‌های قهوه‌ای، برخلاف سایر گوشتخواران پرتحرک، ساختار ژنتیکی کاملاً مشخصی را در سطح جهان نشان می‌دهند که دربرگیرنده چندین کلاد میتوکندریایی است. علاوه بر این، جمعیت‌های خرس قهوه‌ای در خاورمیانه از جمله ایران در تهدید قرار دارند. با این وجود، هنوز جایگاه تبارشناختی و تنوع ژنتیکی این خرس‌ها در مقایسه با تبارهای جهانی خرس قهوه‌ای در ابهام قرار دارد. در پژوهش حاضر، 50 نمونه (عضله، پوست و مو) متعلق به خرس قهوه‌ای از ایران گردآوری شد. تحلیل‌ها براساس یک قطعه 614 جفت باز از ناحیه کنترل میتوکندری انجام شد. براساس یافته‌ها، خرس‌های ایران در مقایسه با خرس‌های قهوه‌ای مناطق دیگر جهان تنوع هاپلوتایپی به نسبت زیادی (50 فرد، 22 هاپلوتایپ) را نشان دادند. تحلیل‌های این ناحیه میتوکندریایی، خرس‌های ایران را در یک کلاد مادری کاملاً مجزا از دیگر کلادهای جهانی قرار داد، که دربرگیرنده دو-سه زیرکلاد گیتاشناختی شامل 1) زیرکلاد البرز: خرس‌های ساکن کوه‌های البرز تا ارسباران، 2) زیرکلاد زاگرس: خرس‌های غرب کشور از کوه‌های سهند (آذربایجان‌شرقی) تا زاگرس جنوبی (کازرون) و 3) زیرکلاد فارس: خرس-های ساکن جنوب‌شرقی زاگرس (مرودشت تا اقلید، استان فارس) است. یافته‌های FST و AMOVA، وجود ساختار ژنتیکی معنی‌داری را بین زیرکلادهای خرس قهوه‌ای در ایران تائید می‌نماید. بنابراین، جمعیت‌های امروزی خرس قهوه‌ای در ایران، علاوه بر تنوع هاپلوتایپی به نسبت زیاد، ساختارهای گیتاشناختی مشخصی را نمایش می‌دهند.

کلمات کلیدی: خرس قهوه‌ای، تنوع هاپلوتایپی، زیرکلاد، البرز، زاگرس

مقدمه

در طول قرن‌های اخیر جمعیت‌های خرس قهوه‌ای، به‌ویژه در اروپای غربی، بخش‌های جنوبی آمریکای شمالی، جنوب آسیا و آفریقای شمالی آسیب‌های زیادی را از دست‌اندازی‌های مستقیم انسان و تغییر زیستگاه‌ها متحمل شدند. خرس‌ها در برخی از این مناطق به‌طور کامل نابود شدند و یا کاهش قابل توجهی را تجربه کرده و به جمعیت‌های کوچک و مجزا محدود شدند (Swenson و همکاران، 2011؛ Zedrosser و همکاران، 2001؛ Servheen و همکاران، 1999). در سطح جهانی، تعداد و گستره توزیع خرس قهوه‌ای در طول 100 سال گذشته در حدود 50 درصد کاهش داشته است (Servheen، 1990). از نظر تاریخی، خرس‌های قهوه-ای بخش گسترده‌ای از خاورمیانه- از صحرای سینا تا نواحی کوهستانی ایران- را اشغال می‌کردند (Boitani و همکاران، 2008)، درحالی‌که امروزه فقط به صورت جمعیت‌های کوچک و مجزا در ایران، عراق و ترکیه حضور دارند (Calvignac و همکاران، 2009؛ Boitani و همکاران، 2008؛ Ridings، 2006). خرس‌های قهوه‌ای خاورمیانه که از آن‌ها به‌عنوان جمعیت‌های غفلت شده یاد می‌شود، جزو جمعیت‌های در خطر انقراض هستند (Davison و همکاران، 2011، Calvignac و همکاران، 2009؛ Boitani و همکاران، 2008؛ Ridings، 2006؛ Can و Togan، 2004).

از سوی دیگر، تمایزهای ریخت‌شناختی اساسی بین خرس-های قهوه‌ای در مناطق مختلف، توصیف شمار زیادی از زیرگونه‌ها را در اوراسیا در پی داشته است. در طبقه‌بندی‌های اولیه بیش از 200 زیرگونه و در جدیدترین بازنگری‌ها تعداد هشت زیرگونه معرفی شده است (Korsten و همکاران، 2009). به‌هر حال، تحلیل‌های ژنتیکی توافق چندانی با این فهرست‌ها نشان نمی‌دهند. برای نمونه، تحلیل توالی‌های سیتوکروم b و ناحیه کنترل میتوکندری، فقط یک هاپلوگروپ را در تمام جمعیت‌های خرس قهوه‌ای ساکن در شمال اوراسیا شناسایی نموده است (ناحیه-ای به‌اندازه $_{12000}$ کیلومتر از شرق تا غرب) (Korsten و همکاران، 2009). با این وجود، ممکن است عوامل بوم‌شناختی در مقایسه با

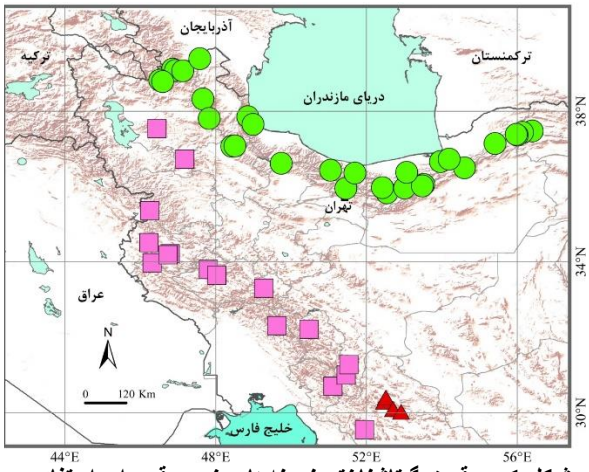
* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mkaboli@ut.ac.ir

عوامل ژنتیکی توضیح بهتری را برای وجود اختلاف‌های ریخت-شناختی بین زیرگونه‌های شناسایی شده-زیرگونه‌هایی که بر اساس تمایزهای ریخت‌شناختی توصیف شده‌اند و تحلیل‌های ژنتیکی توافقی با آن‌ها ندارند- ارایه دهند (Paetkau و همکاران، 1998). در مجموع هنوز توافق همگانی در زمینه آرایه‌شناسی خرس‌های قهوه‌ای وجود ندارد (Keis، 2013).

مدیریت و حفاظت از حیات‌وحش نیازمند داشتن تصویری جامع از تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی در ساختارهای گیتاشناختی است. جمعیت‌های خرس قهوه‌ای بر خلاف سایر گوشت‌خواران پرتحرک، ساختار تبارگیتاشناختی گسترده‌ای (براساس ژنوم میتوکندری) را در سطح جهان نشان می‌دهند (Davison و همکاران، 2011؛ Calvignac و همکاران، 2008). در این میان، خرس‌های قهوه‌ای در خاورمیانه از جمله ایران بخش عمده‌ای از گستره تاریخی خود را از دست داده و در خطر انقراض هستند (Boitani و همکاران، 2008؛ Calvignac و همکاران، 2009). از سوی دیگر، توسعه و گستردگی فعالیت-های انسانی در ایران (به‌عنوان کشوری در حال توسعه) می‌تواند پیامدهای جبران‌ناپذیری بر جمعیت‌های گوشت‌خواران بزرگ جثه (مانند خرس قهوه‌ای) داشته باشد. بنابراین دست‌یابی به دانش قابل اطمینان در زمینه تنوع و وضعیت ژنتیکی جمعیت‌های خرس قهوه‌ای در مناطق مختلف کشور از اهمیت بالایی برخوردار است. در این پژوهش، تلاش بر این است که با استفاده از ناحیه کنترل (Control region) میتوکندریایی جایگاه تبارشناختی و تنوع ژنتیکی خرس‌های قهوه‌ای ایران در مقایسه با سایر خرس-های قهوه‌ای جهان مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

محدوده مورد مطالعه، در برگیرنده گستره زیستگاه‌های خرس قهوه‌ای در کوه‌های البرز، زاگرس و آذربایجان است. تعداد 50 نمونه (عضله، پوست و مو) از سال 1391 تا 1394 گردآوری شد. شکل (1) موقعیت گیتاشناختی نمونه‌های استفاده شده در تحلیل‌های ژنتیکی را نشان می‌دهد. برای استخراج دی-ان‌ای از کیت مخصوص استخراج دی‌ان‌ای از بافت ساخت شرکت‌های کیاژن و بیونیر و با دستورالعمل شرکت‌سازنده استفاده شد. برای تکثیر توالی‌های مورد نظر از دی‌ان‌ای با غلظت 20 تا 80 نانوگرم استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از مسترمیکس‌های با غلظت 1/5 میلی مولار $MgCl_2$ ساخت شرکت امپلیکن دانمارک انجام شد. ترکیب مسترمیکس شرکت امپلیکن به شرح زیر است: Tris-HCl با pH 8/5، $(NH_4)_2SO_4$، 3میلی‌مولار از $MgCl_2$، 0/2% از Tween®20، 4/میلی‌مولار از هر dNTP، 2/واحد/میکرولیتر امپلیکن Taq دی‌ان‌ای پلی‌مراز. ترکیب مواد به‌کار رفته در واکنش PCR در حجم 25 میکرولیتر شامل 12/5 میکرولیتر از مسترمیکس، میکرولیتر 25/1 از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، 1 میکرولیتر دی‌ان‌ای و 9 میکرولیتر آب دو بار تقطیر استفاده شد. در هنگام آماده‌سازی نمونه‌ها برای واکنش PCR، یک میکروتیوب به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. یک قطعه 614 جفت باز مربوط به بخشی از ناحیه کنترل میتوکندری و بخش انتهایی '5 در ژن tRNA-Pro با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی (Hailer و همکاران، 2012) تکثیر شد: UCRS1F (5'-ACAGCTCCACTACCAGCACCC-3') و UCRS1R (5'-GTACACGTGCGTCGTTCGTTC-3'). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ۳۵ چرخه با واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد در پنج دقیقه، واسرشت 94 درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در 61 درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، گسترش زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی زنجیره در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مدت پنج دقیقه اجرا شد.



شکل 1: موقعیت گیتاشناختی نمونه‌های خرس قهوه‌ای استفاده شده در تحلیل‌ها

شکل‌های هندسی، زیرکلادهای شناسایی شده را نشان می‌دهند: دایره: زیرکلاد البرز، مربع: زیرکلاد زاگرس، مثلث: زیرکلاد فارس

از نرم‌افزار Seqscape 3/0 برای ویرایش نوکلئوتیدی توالی‌ها استفاده شد. ردیف‌یابی توالی‌ها با استفاده از ClustalW (Thompson و همکاران، 1994) در نرم‌افزار Mega 6 (Tamura و همکاران، 2013) انجام شد. توالی‌های متعلق به خرس سیاه آسیایی (*U. thibetanus*)، خرس سیاه آمریکایی (*U. americanus*) و خرس غار (*U. spelaeus*) به‌عنوان برون‌گروه استفاده شدند.

بهترین مدل‌های جایگزینی نوکلئوتیدی با استفاده از PartitionFinder 1.1.1 (Lanfear و همکارن، 2014 و 2012) با معیار اطلاعاتی بیزین تعیین شد. درخت‌های تبارشناختی با استفاده از شیوه‌های احتمال بیشینه و استنتاج بیزین رسم شدند. تحلیل‌های بیزین با استفاده از نرم‌افزار MrBayes 3.2.2 (Ronquist و Huelsenbeck، 2003)، بر اساس چرخه زنجیره مارکوف (MCMC) با چهار اجرای هم‌زمان و تعداد 50 میلیون تکرار اجرا شد. نمونه‌برداری‌ها در هر 1000 تکرار انجام شد و 10 درصد درخت‌های حاصل شده از تحلیل کنار گذاشته شدند و برای دست‌یابی به بهترین درخت از قانون اکثریت استفاده شد. تحلیل-های احتمال بیشینه با استفاده از RAxML 8.2 (Stamatakis، 2014)، با مدل GTRGAMMA انجام شد. به‌منظور اجتناب از بهینه‌سازی محلی در استنتاج درخت به‌دست آمده، جستجوهای احتمال بیشینه با 200 تکرار اجرا شد. تعداد 1000 تکرار برای دست‌یابی به درخت بوت‌استرپ و 1000 تکرار برای دست‌یابی به درخت بوت‌استرپ سریع در نظر گرفته شد. علاوه بر این، روابط تبارشناختی بین هاپلوتایپ‌ها، براساس تحلیل اتصال میانه

(Bandelt و همکاران، 1999) برآورد شد. به این منظور، از نرم‌افزار Network 4.6.1.3 برای استنتاج روابط تبارشناختی بین هاپلوتایپ‌ها در توالی‌های ناحیه کنترل استفاده شد. تعداد هاپلوتایپ‌ها، جایگاه‌های چندریختی، تنوع هاپلوتایپی و تنوع نوکلئوتیدی با استفاده از DnaSP 5.10 (Librado و Rozas، 2009) محاسبه شد.

برای تعیین سطوح ساختار جمعیتی از تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) و نمایه F_{ST} (Weir و Cockerham، 1984) در نرم‌افزار Arlequin 3.5 (Excoffier و Lischer، 2010) استفاده شد. تحلیل‌ها با 10000 تکرار و در دو سطح سلسله مراتبی انجام شد. در اولین سطح تنها خرس‌های قهوه‌ای ایران در تحلیل استفاده شدند، در حالی که در دومین سطح تمامی کلادهای خرس قهوه‌ای و خرس قطبی تحلیل شدند.

نتایج

تحلیل تبارشناختی قطعه 614 جفت باز از ناحیه کنترل براساس دو شیوه استنتاج بیزین و احتمال بیشینه، نتایج مشابهی را به‌دست داد (شکل 2). بر این اساس، خرس‌های قهوه‌ای ایران در تباری مجزا از دیگر خرس‌های قهوه‌ای جهان و در سه زیرکلاد مجزای گیتاشناختی دربرگیرنده البرز (شمال ایران)، زاگرس (غرب ایران) و زاگرس جنوب شرقی (فارس) تقسیم شدند. زیرکلاد البرز ($_{30}$نمونه) تمامی خرس‌های قهوه‌ای ساکن در شمال ایران از شرق البزر (خراسان شمالی) تا کوه‌های ارسباران (آذربایجان‌شرقی) را در بر می‌گیرد. این جمعیت دربرگیرنده موقعیت‌های نمونه‌برداری پیوسته از منطقه حفاظت شده قرخود تا پارک ملی گلستان، دامغان، مینودشت، کردکوی، بندر گز، ساری، آمل، منطقه حفاظت شده پرور، منطقه حفاظت شده البرز مرکزی، فیروزکوه، شمیرانات، کلاردشت، رودبار، منطقه حفاظت شده سرخ آباد، تالش، کوه‌های بزغوش، مشکین شهر، منطقه حفاظت شده مغان، کلیبر، منطقه حفاظت شده ارسباران و منطقه حفاظت شده دیزمار است. خرس‌های قهوه‌ای غرب کشور (16 نمونه) از زاگرس جنوبی در محدوده کازرون (استان فارس) تا کهگیلویه و بویراحمد، اصفهان (سمیرم)، چهارمحال و بختیاری، لرستان، خوزستان، ایلام، کرمانشاه، کردستان، تکاب (آذربایجان‌غربی) و بخش جنوبی کوه‌های سهند (آذربایجان‌شرقی) زیرکلاد زاگرس را تشکیل دادند. نکته قابل توجه این‌که خرس‌های قهوه‌ای زاگرس جنوب‌شرقی، که به‌نظر می‌رسد از نظر گیتاشناختی در یک محدوده مجزای به نسبت کوچک در شهرستان‌های مرودشت و امامزاده اسماعیل و اقلید ساکن هستند، یک زیرکلاد مجزای دیگری را نسبت به سایر خرس‌های زاگرس به خود اختصاص می‌دهند.

تحلیل شبکه هاپلوتایپی خرس‌های ایران را در سه زیرکلاد مجزا قرار می‌دهد (شکل 3). بر این اساس، خرس‌های نوار شمالی ایران (30 نمونه) از منطقه حفاظت شده قرخود (خراسان شمالی) در شرق البرز و در امتداد رشته کوه‌های البزر تا غرب البزر و از آن‌جا تا مناطق حفاظت شده ارسباران و دیزمار (آذربایجان‌شرقی)، با 14 هاپلوتایپ، در زیرکلاد البرز قرار گرفتند. در این تحلیل، پنج نمونه از تهران (ارجمند)، مازندران (سوادکوه)، سمنان (منطقه حفاظت شده پرور)، گلستان (کردکوی و مینودشت) در یک هاپلوتایپ مشترک قرار می‌گیرند. هاپلوتایپ مشترک دیگر بین پنج نمونه از آذربایجان-شرقی (منطقه حفاظت شده ارسباران، شمال کلیبر، بزغوش)، زنجان (منطقه حفاظت‌شده‌سرخ‌آباد) و مازندران (لاریجان) شکل می‌گیرد. هم‌چنین، چهار نمونه از آذربایجان‌شرقی (شمال ارسباران)، اردبیل (منطقه حفاظت شده مغان)، گیلان (تالش) و سمنان (منطقه حفاظت شده پرور) هاپلوتایپ مشترک دیگری را تشکیل می‌دهند. خرس‌های غرب کشور (16 نمونه)، همانند درخت تبارشناسی، از کازرون (فارس) در جنوب زاگرس و در امتداد رشته کوه‌های زاگرس تا زاگرس شمالی و جنوب کوه‌های آذربایجان (سهند) به زیرکلاد زاگرس تعلق دارند. عمومی‌ترین هاپلوتایپ در این منطقه با در برگرفتن هشت نمونه در گستره‌ای از استان‌های فارس (کازرون)، کهگیلویه و بویراحمد (کوه‌های ساورز)، اصفهان (منطقه حفاظت شده دنا و سمیرم)، لرستان (منطقه حفاظت شده سفیدکوه، منطقه حفاظت شده اشتران‌کوه)، خوزستان (منطقه حفاظت شده شیمبار) و کرمانشاه (منطقه حفاظت شده قلاجه) شکل می‌گیرد. خرس‌های ساکن جنوب‌شرق زاگرس (چهار نمونه) در محدوده مرودشت و امامزاده اسماعیل، به یک هاپلوتایپ تعلق داشته و در زیرکلاد فارس قرار می‌گیرند.

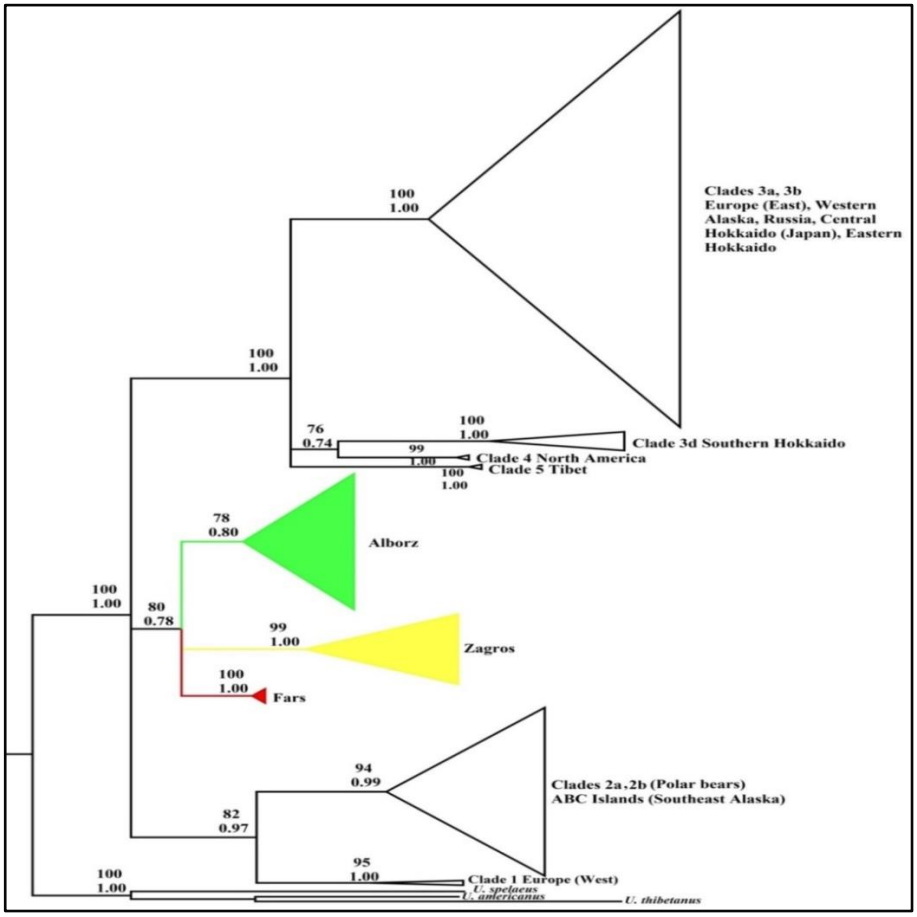
در سطح جهانی، عمومی‌ترین هاپلوتایپ به کلاد 3a اختصاص دارد که در بین 93 فرد متعلق به آلاسکا، شرق دور روسیه تا روسیه مرکزی، روسیه غربی، استونی، فنلاند، رومانی و بلغارستان مشاهده شده است. سایر کلادها در مقایسه با کلاد 3a پراکنش به نسبت محدودتری دارند. کلاد 3b در شرق هوکایدو (ژاپن)، شرق دور روسیه و آلاسکا حضور دارد. کلاد 4 در آمریکای شمالی و کلاد 1 در اروپای غربی مشاهده می‌شود. هاپلوتایپ‌های متعلق به کلاد 3d فقط در جنوب هوکایدو مشاهده می‌شوند. کلاد 2a فقط در جزایر ABC در آلاسکا مشاهده شده است.

تحلیل AMOVA نشان داد که اختلاف ژنتیکی در بین زیرکلادهای جهانی (88/81 درصد) بیش از اختلاف ژنتیکی در داخل (11/19 درصد) این گروه‌ها است (جدول 1). هم‌چنین، تحلیل AMOVA نشان داد که اختلاف ژنتیکی بسیار زیاد و معنی-داری در بین زیرکلادهای ایران (78/32 درصد) وجود دارد. علاوه بر این، نمایه FST نیز وجود یک ساختار ژنتیکی معنی‌دار را در بین زیرکلادهای شناسایی شده خرس قهوه‌ای در ایران مورد تائید قرار می‌دهد (جدول1).

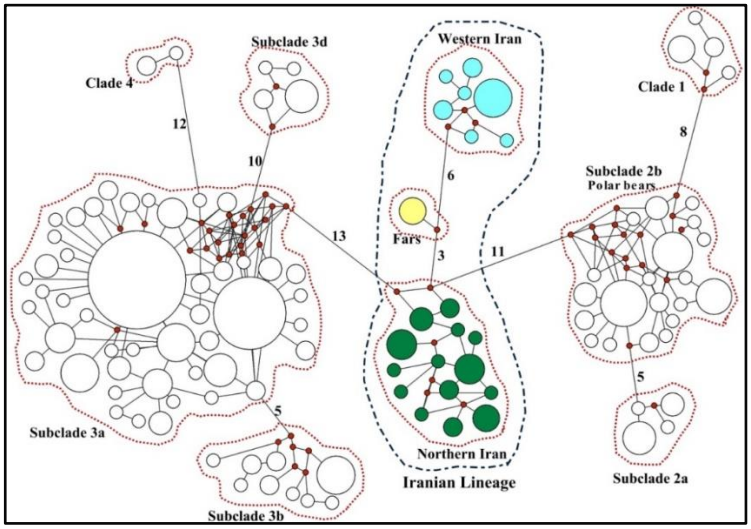
جدول2 برخی آماره‌های ژنتیکی مربوط به قطعه 614 جفت باز از ناحیه کنترل را بر اساس یک دسته داده شامل 50 توالی از ایران و 321 توالی استخراج شده از بانک ژن نشان می‌دهد. در مجموع، 84 جایگاه متغیر (74 جایگاه پارسیمونی و 10 جایگاه تک نوکلئوتیدی) و 111 هاپلوتایپ شناسایی شد. در بین توالی‌های ایران، 22 هاپلوتایپ جدید شناسایی شد. زیادترین و کم‌ترین تنوع هاپلوتایپی در میان تمامی جمعیت‌های خرس قهوه‌ای، به‌ترتیب در بین خرس‌های البرز (0/926)، انحراف معیار=0/2411) و خرس‌های فارس (0/000) مشاهده شد. تنوع نوکلئوتیدی در بین خرس‌های البرز و زاگرس به‌ترتیب در حدود 0/00478 (انحراف معیار= 0/00035) و 0/0041 (انحراف معیار= 0/00083) برآورد شد. قابل ذکر است که اغلب کلادهای جهانی همانند خرس‌های ایران از تنوع نوکلئوتیدی به نسبت کم برخوردار بوده‌اند.

جدول 1: تحلیل واریانس مولکولی. تحلیل اول: در بین سه زیرکلاد ایران، تحلیل دوم: در بین تمامی زیرکلادها و کلادهای خرس قهوه‌ای و خرس قطبی

منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد تغییرات	F_{ST}	*p*-value
تحلیل اول				
بین زیرکلادها	2	78/32	0/783	0/000
درون زیرکلادها	47	21/68		
تحلیل دوم				
بین زیرکلادها	9	88/81	0/888	0/000
درون زیرکلادها	178	11/19		



شکل 2: روابط تبارشناختی بین خرس‌های قهوه‌ای ایران و سایر خرس‌های قهوه‌ای و قطبی براساس 614 جفت باز از ناحیه کنترل میتوکندری خرس‌سیاه آسیایی(*U. thibetanus*)، خرس‌سیاه‌آمریکایی(*U. americanus*)و خرس غار(*U. spelaeus*)به‌عنوان برون‌گروه استفاده شدند.
اعداد روی شاخه‌ها مقدار بوت استرپ (بالا) و احتمال پسین (زیر) را به‌ترتیب براساس احتمال بیشینه و استنتاج بیزین نشان می‌دهند.



شکل 3: روابط تبارشناختی بین خرس‌های قهوه‌ای ایران و سایر خرس‌های قهوه‌ای و قطبی با استفاده از روش اتصال میانه، بر اساس توالی‌های 614 جفت باز از ناحیه کنترل میتوکندری

جدول 2: برخی آماره‌های ژنتیکی برای خرس‌های ایران در مقایسه با سایر کلادهای خرس‌های قهوه‌ای و قطبی براساس توالی 614 جفت باز از ناحیه کنترل

گروه	*n*	*h*	*Hd* (SD)	*Pi* (SD)	*K*	*P*
کلاد 1	8	4	0/750(0/139)	0/00465(0/00175)	2/857	9
کلادa2	11	4	0/673(0/123)	0/00344(0/00067)	2/109	5
کلادb2	52	20	0/900(0/024)	0/00498(0/00047)	3/059	18
کلادa3	218	46	0/797(0/026)	0/00275(0/00018)	1/69	30
کلادb3	19	9	0/819(0/082)	0/00937(0/0013)	5/754	19
کلادd3	10	4	0/644(0/152)	0/00358(0/00122)	2/2	7
کلاد 4	3	2	0/667(0/314)	0/00217(0/0010)	1/333	2
زیرکلاد البرز	30	14	0/926(0/024)	0/00478(0/00035)	2/933	10
زیرکلاد زاگرس	16	7	0/752(0/107)	0/0041(0/00083)	2/517	10
زیرکلاد فارس	4	1	0/000	0/0000	0/00	0

میتوکندری. *n*: تعداد افراد؛ *h*: تعداد هاپلوتایپ؛ *Hd*: تنوع هاپلوتایپی؛ *SD*: انحراف معیار؛ *Pi*: تنوع نوکلئوتیدی به‌ازای هر جایگاه؛ *K*: متوسط تعداد اختلاف نوکلئوتیدی؛ *P*: تعداد جایگاه‌های متغیر.

بحث

در آرایه‌شناسی کلاسیک، خرس‌های قهوه‌ای خاورمیانه با ویژگی‌هایی از قبیل اندازه جثه کوچک، دندان‌های آسیای کوچک و بور بودن پوشش بدن و بیشتر بر پایه جنبه‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی تنها به‌عنوان یک زیرگونه (*U. arctos syriacus*) شناخته شده است (Kurten، 1965). به‌هر حال، الگوی‌های ژنتیکی ارائه شده توافقی با این توصیف ندارند (Calvignac و همکاران، 2009؛ Miller و همکاران، 2006؛ Talbot و Shields، 1996). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که خاورمیانه و شمال آفریقا، از نظر تاریخی موطنی برای چندین کلاد (کلادهای 5، 6، شمال آفریقا و ایران) بوده‌اند. روابط این کلادها با سایر خرس‌های قهوه‌ای روشن نشده است (Davison و همکاران، 2011). عدم دسترسی به نمونه‌های کافی از جمعیت‌های خاورمیانه سبب شده است تا تجزیه و تحلیل درستی از موقعیت این جمعیت‌ها در ارتباط با سایر کلادها ممکن نباشد. با این وجود، پژوهش‌های انجام شده به کمک ناحیه کنترل میتوکندری و نیز سیتوکروم *b* برای تعداد اندکی از خرس‌های خاورمیانه (تعداد 10 فرد، توالی‌های کوچک‌تر از 300 جفت باز) منجر به‌شناسایی حداقل شش هاپلوتایپ میتوکندریایی مختلف‌شده است (Calvignac و همکاران، 2009؛ Miller و همکاران، 2006؛ Talbot و Shields، 1996). این یافته‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً جمعیت‌های خرس قهوه‌ای در منطقه خاورمیانه از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار بوده و حداقل به سه کلاد متمایز متعلق‌اند (Calvignac

و همکاران، 2009). براساس بررسی‌ها، برخی‌نمونه‌های خرس قهوه‌ای سوری ارتباط بسیار نزدیکی را با کلاد 3a (شامل جمعیت‌هایی از اروپای شرقی، آسیا و آمریکای شمالی) نشان می‌دهند (Murtskhvaladze و همکاران، 2010؛ Calvignac و همکاران، 2009؛ Taberlet و Bouvet، 1994). از سوی دیگر، خرس‌های قهوه‌ای لبنان (نمونه فسیلی) ارتباط نزدیکی را با کلاد 1 نشان می‌دهند (Taberlet و Bouvet، 1994). به‌هر حال، نمونه فسیلی لبنان اختلاف به نسبت زیادی با سایر هاپلوتایپ‌های کلاد 1 دارد (Valdiosera و همکاران، 2007). بنابراین، احتمالاً کلاد اروپای غربی در گذشته تنوع ژنتیکی بالاتری نسبت به امروز داشته است. همچنین، به‌نظر می‌رسد این کلاد در گذشته گستره بزرگ‌تری را نسبت به امروز اشغال می‌کرده است. این کلاد از نظر تاریخی در اروپای غربی، آفریقای شمالی و خاورمیانه حضور داشته است (Calvignac و همکاران، 2008).

خرس‌های قهوه‌ای قفقاز (گرجستان)، براساس‌تحلیل قطعه 271 جفت باز، به دو هاپلوگروپ مجزا تقسیم شده و در کلاد 3a قرار می‌گیرند (Murtskhvaladze و همکاران، 2010). خرس‌های قفقاز، در مقایسه با دیگر توالی‌های متعلق به کلاد 3a، نزدیک‌ترین رابطه را با خرس‌های خاورمیانه (توالی‌های متعلق به کلاد 3a) نشان می‌دهند، اگرچه هیچ هاپلوتایپ مشترکی بین آن‌ها وجود ندارد. همچنین، یک پژوهش اخیر در ترکیه (Çilingir و همکاران، 2016) که براساس یک قطعه 269 جفت باز از ناحیه کنترل (35 نمونه، 14 هاپلوتایپ) انجام شده است، تنوع قابل توجهی از حضور تبارهای مادری خرس قهوه‌ای را در این کشور تائید می‌کند. براساس این پژوهش، توالی‌هایی از کلاد 3a، کلاد 1 و تبار ایران در ترکیه ثبت شده است (Çilingir و همکاران، 2015). حضور کلادهای 1 و 3a در ترکیه همراه با گزارش نمونه‌هایی از توالی‌های امروزی تبار ایران در خرس‌های ترکیه وجودیک ارتباط پیچیده را در این بخش از گستره پراکنش خرس‌های قهوه‌ای مورد تائید قرار می‌دهد.

پیش از این، سه نمونه خرس قهوه‌ای (271 جفت باز از ناحیه کنترل) متعلق به شمال‌غرب ایران در تحلیل‌های تبارشناختی استفاده شده‌اند (Calvignac و همکاران، 2009؛ Miller همکاران، 2006). بر پایه تحلیل‌ها، این خرس‌ها در هیچ‌کدام از کلادهای شناسایی شده جای نگرفته و احتمالاً یک کلاد متمایز از دیگر کلادهای خاورمیانه تشکیل می‌دهند (Davison و همکاران، 2011؛ Calvignac و همکاران، 2009؛ Miller و همکاران، 2006). علاوه بر این، انتظار می‌رود خرس‌های ایران از تنوع ژنتیکی قابل توجهی برخوردار هستند، چرا که مطالعه سه نمونه از خرس‌های ایران، منجر به کشف سه هاپلوتایپ جدید شده است (Calvignac و همکاران، 2009). در مجموع، همه پژوهش‌های پیشین بر این نکته اتفاق نظر دارند که در حال حاضر نمی‌توان جایگاه مشخصی برای خرس قهوه‌ای ایران اعلام نمود و نمونه‌برداری و انجام بررسی‌های گسترده در این زمینه، ضروری است (Davison و همکاران، 2011؛ Calvignac و همکاران، 2009؛ Calvignac و همکاران، 2008؛ Miller و همکاران، 2006).

در این پژوهش، 50 نمونه خرس قهوه‌ای از ایران براساس یک قطعه614جفت باز از ناحیه‌کنترل‌میتوکندری‌توالی‌یابی‌شد. یافته‌های حاصل از تحلیل‌های بیشینه‌احتمال‌وبیزین به‌طور مشابه و باارزش‌های بوت‌استرپ و احتمال پسین بالا خرس‌های قهوه‌ای ایران را در یک تبار کاملاً مجزا از کلادهای‌جهانی‌خرس قهوه‌ای قرار دادند. خرس‌های ایران جدا از سایر کلادهای شناخته شده به سه زیرکلاد مجزا شامل: (1) زیرکلاد البرز (30 نمونه، 14 هاپلوتایپ)، (2) زیرکلاد زاگرس (16 نمونه، هفت هاپلوتایپ) و (3) زیرکلاد فارس در جنوب‌شرقی زاگرس (4 نمونه، یک هاپلوتایپ) تقسیم شدند. در این تحلیل تمامی خرس‌های قهوه‌ای ساکن البرز تا ارسباران در اولین زیرکلاد (البرز) قرار گرفتند. گستره گیتاشناختی دومین زیرکلاد (زاگرس)، به‌طور پیوسته دربرگیرنده تمامی خرس‌های قهوه‌ای از سهند (آذربایجان شرقی) تا تکاب و از آن‌جا تا کردستان، کرمانشاه، ایلام، لرستان، چهارمحال و بختیاری، اصفهان، کهگیلویه و بویراحمد، خوزستان و کازرون (در استان فارس) است. چهار نمونه در محدوده مرودشت و امامزاده اسماعیل (استان فارس) زیرکلاد سوم را تشکیل دادند.

یافته‌های این مطالعه موافق با پیش‌بینی‌های سایر پژوهش‌ها (Davison و همکاران، 2011؛ Calvignac و همکاران، 2009؛ Galbreath و همکاران، 2007؛ Miller و همکاران، 2006) بر این نکته تاکید دارد که خرس‌های قهوه‌ای ایران از تمامی کلادهای خرس قهوه‌ای در جهان مجزا بوده و در یک کلاد جداگانه قرار می‌گیرند. همچنین قابل ذکر است که خرس‌های ایران از خرس‌های قفقاز (Murtskhvaladze و همکاران، 2010)، ترکیه و لبنان (Calvignac و همکاران، 2009؛ Miller و همکاران، 2006؛ Talbot و Shields، 1996)در شمال‌غرب و غرب و خرس‌های پاکستان(Miller و همکاران، 2006) در شرق کشور به‌طور کامل مجزا هستند.

حضور دو یا سه زیرکلاد خرس قهوه‌ای در ایران و به ویژه گستره پراکنش آن‌ها، به یک تمایز گیتاشناختی مشابه آن‌چه که در الگوهای شناخته شده در خرس‌های قهوه‌ای ساکن در آمریکای شمالی، اروپا و آسیا دیده می‌شود، اشاره دارد (Hirata و همکاران، 2013؛ Keis و همکاران، 2013؛ Calvignac و همکاران، 2009؛ Korsten و همکاران، 2009؛ Miller و همکاران، 2006؛ Kohn و همکاران، 1995؛ Taberlet و Bouvet، 1994؛ Randi و همکاران، 1994) در حال حاضر به‌نظر می‌رسد زیرکلاد فارس به یک گستره گیتاشناختی کوچک واقع در کوه‌های جنوب‌شرقی زاگرس (مرودشت، امامزاده اسماعیل و اقلید و باغ شادی) محدود شده است، درحالی‌که دو زیرکلاد دیگر (البرز و زاگرس) پراکنش به نسبت گسترده‌تری در ایران دارند.

به‌طور خلاصه، خرس‌های ایران در مقایسه با خرس‌های قهوه‌ای آمریکای شمالی و اروپا (Hirata و همکاران، 2013؛ Keis و همکاران، 2013؛ Calvignac و همکاران، 2009؛ Miller و همکاران، 2006؛ Waits و همکاران، 1998) تنوع هاپلوتایپی به نسبت زیادی در توالی ناحیه کنترل میتوکندری نشان می‌دهند. یافته‌های F_{ST} و AMOVA، وجود ساختار ژنتیکی معنی‌دار بین زیرکلادهای خرس قهوه‌ای در ایران را تائید می‌نماید. بنابراین، جمعیت‌های امروزی خرس قهوه‌ای در ایران، علاوه‌بر تنوع‌هاپلوتایپی‌به‌نسبت‌زیاد، ساختارهای گیتاشناختی مشخصی را نمایش می‌دهند.

تشکر و قدردانی

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 فناوران‌کشور (INSF)و همچنین همکاری‌سازمان‌حفاظت‌محیط‌زیست‌به انجام رسیده است که مراتب سپاس و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

1. **Bandelt, H.J.; Forster, P. and Röhl, A., 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution. Vol. 16, pp: 37-48.
2. **Boitani, L.; Jdeidi, T.; Masseti, M.; de Smet, K. and Cuzin, F., 2008.** *Ursus arctos*. IUCN Red List of Threatened Species, Version 2009.1. **Calvignac, S.; Hughes, S.; Tougard, C.; Michaux, J.; Thevenot, M.; Philippe, M.; Hamdine, W. and Hänni, C., 2008.** Ancient DNA evidence for the loss of a highly divergentbrown bear clade during historical times. Molecular Ecolo. Vol. 17, pp: 1962-1970.
3. **Calvignac, S.; Hughes, S. and Hänni, C., 2009.** Genetic diversity of endangered brownbear (*Ursus arctos*) populations at the cross roads of Europe, Asia and Africa. Diversity and Distributions. Vol. 15, pp: 742-750.
4. **Can, O. and Togan, I., 2004.** Status and management of brown bears in Turkey. Ursus 15, pp: 48-53.
5. **Çilingir, F.G.; Peksen, C.A.; Ambarli, H.; Beerli, P. and Bilgin, C.C., 2015.** Exceptional maternal lineage diversity in brown bears (*Ursus arctos*) from Turkey. Zoological Journal of the Linnean Society. doi: 10.1111/zoj.12322.
6. **Davison, J.; Ho, S.Y.W.; Bray, S.C.; Korsten, M.; Tammeleht, E.; Hindrikson, M.; Østbye, K.; Østbye, E.; Lauritzen, S.E.; Cooper, A. and Saarma, U., 2011.** Late Quaternary biogeographic scenarios for the brown bear (*Ursus arctos*), a wild mammal model species. Quaternary Science Reviews. Vol. 30, pp: 418-430.
7. **Excoffier, L. and Lischer, H.E.L., 2010.** Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. Vol. 10, pp: 564-567.
8. **Galbreath, G.J.; Groves, C.P. and Waits, L.P., 2007.** Genetic resolution of composition and phylogenetic placement of the Isabelline Bear. Ursus. Vol. 18, pp: 129-131.
9. **Hailer, F.; Kutschera, V.E.; Hallstrom, B.M.; Klassert, D.; Fain S.R.; Arnason, U. and Janke, A., 2012.** Nuclear genomic sequences reveal that polar bears are an old and distinct bear lineage. Science. Vol. 336, pp: 344-347.
10. **Hirata, D.; Mano, T.; Abramov, A.V.; Baryshnikov, G.F. and Kosintsev, P.A., 2013.** Molecular phylogeography of the brown bear (*Ursus arctos*) in northeastern Asia based on analyses of complete mitochondrial DNA sequences. Molecular Biology and Evolution. Vol. 30, pp: 1644–1652.
11. **Keis. M., 2013.** Brown bear (*Ursus arctos*) phylogeography in northern Eurasia. PhD Thesis. Department of Zoology, Faculty of Science and Technology, University of Tartu, Estonia. 65 p.
12. **Keis, M.; Remm, J.; Ho, S.Y.W.; Davison, J.; Tammeleht, E.; Tumanov, I.L.; et al., 2013.** Complete mitochondrial genomes and a novel spatial genetic method reveal cryptic phylo geographical structure and migration patterns among brown bears in north-western Eurasia Journal of Biogeography. Vol. 40, pp: 915-927.
13. **Kohn, M.; Knauer, F.; Stoffella, A.; Schroder, W. and Paabo, S., 1995.** Conservation genetics of the European brown bear using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. Molec Ecology. Vol. 4, pp: 95-103.
14. **Korsten, M.; Ho, S.Y.W.; Davison, J.; Pahn, B.; Vulla, E. and Roht, M., 2009.** Sudden expansion of a single brown bear maternal lineage across northern continental Eurasia after the last ice age: a general demographic model for mammals? Mol Ecolo. Vol. 18, pp: 1963-1979.
15. **Lanfear, R.; Calcott, B.; Ho, S.Y. and Guindon, S., 2012.** PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Molecular Biology and Evolution. Vol. 29, pp: 1695-1701.
16. **Lanfear, R.; Calcott, B.; Kainer, D.; Mayer, C. and Stamatakis, A., 2014.** Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. BMC Evolutionary Biology. Vol. 14, 82 p.
17. **Librado, P. and Rozas, J., 2009.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. Vol. 25, pp: 1451-1452.
18. **Miller, C.R.; Waits, L.P. and Joyce, P., 2006.** Phylogeography and mitochondrial diversity of extirpated brown bear (*Ursus arctos*) populations in the contiguous United States and Mexico. Molecular Ecology. Vol. 15, pp: 4477-4485.
19. **Murtskhvaladze, M.; Gavashelishvili, A. and Tarkhnishvili, D., 2010.** Geographic and genetic boundaries of brown bear (*Ursus arctos*) population in the Caucasus. Molecular Ecology. Vol. 19, pp: 1829-1841.
20. **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. Vol. 12, pp: 418-429.
21. **Randi, E.; Gentile, L.; Boscagli, G.; Huber, D. and Roth, H.U., 1994.** Mitochondrial DNA sequence divergence among some west European brown bear (*Ursus arctos* L.) populations. Lessons for conservation. Journal of Heredity. Vol. 73, pp: 480-489.
22. **Ridings, C., 2006.** Green bear in the desert. International Bear News. Vol. 15, pp: 12-13.
23. **Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. Vol. 19, pp: 1572-1574.
24. **Servheen, C., 1990.** The status and conservation of the bears of the world. International Association for Bear Research and Management Monograph Series No. 2.
25. **Servheen, C.; Herrero, S. and Peyton, B., 1999.** Bears: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland. 320 p.
26. **Stamatakis, R., 2014.** RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. Bioinformatics.
27. **Swenson, J.E.; Taberlet, P. and Bellemain, E., 2011.** Genetics and conservation of European brown bears *Ursus* arctos. Mammal Review. Vol. 41, pp: 87-98.
28. **Taberlet, P. and Bouvet, J., 1994.** Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeo graphy and conservation genetics of the brown bear Ursus arctos in Europe. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. Vol. 255, pp: 195-200.
29. **Talbot, S.L. and Shields, G.F., 1996.** Phylogeography of brown bears (*Ursus arctos*) of Alaska and paraphyly within the Ursidae. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 5, pp: 477-494.
30. **Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. and Kumar, S., 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution. Vol. 30, pp: 2725-2729.
31. **Thompson, J.D.; Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994.** ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22, pp: 4673-4680.
32. **Valdiosera, C.; Garcia, N.; Anderung, C.; Dalen, L.; Cregut-Bonnoure, E.; Kahlke, R.D.; Stiller, M.; Brandström, M.; Thomas, M.G.; Arsuaga, J.; Götherström, A. and Barnes, I., 2007.** Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. Molecular Ecology. Vol. 16, pp: 5140-5148.
33. **Waits, L.P.; Talbot, S.; Ward, R. and Shields, G.F., 1998.** Mitochondrial DNA phylogeography of the north American brown bear and implications for conservation. Conservation Biology. Vol. 12, pp: 408-417.

34. **Weir, B.S. and Cockerham, C.C., 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. Evolution. Vol. 38, pp: 1358-1370.

35. **Zedrosser, A.; Dahle, B.; Swenson, J. and Gerstl, N., 2001.** Status and management of the brown bear in Europe. Ursus. Vol. 12, pp: 9-20.