

کاربرد برنامه GENELAND در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت

Application of GENELAND to investigate population structure

منصوره ملکیان

استادیار دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان

Malekian M

Assistant Professor, Natural Resources of Isfahan University of Technology, Isfahan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mmalekian@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

برنامه GENELAND در سالیان اخیر به عنوان یکی از برنامه های آماری کاربردی در زمینه تحلیل ساختار ژنتیکی جمعیت مطرح شده است. با تلفیق داده های ژنتیک حاصل از نشاتگرهای چیره و همچیره و داده های مکانی و بدون نیاز به تعیین مرزهای جمعیت، تعداد گروه های همگن و نقشه توزیع مکانی آنها را می توان بدست آورد. اطلاعات حاصل در زمینه ساختار ژنتیکی جمعیت و در نتیجه مدیریت و حفاظت گونه ها کاربرد دارد. در این پژوهش داده های ژنتیکی حاصل از نه ریزماهورک برای بررسی ساختار ژنتیکی ۱۳ جمعیت از یک گونه پستاندار کیسه دار درختزی (*Petaurus breviceps*) و ارزیابی تأثیر پارامترهای سرزمین بر آن استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که چهار گروه ژنتیکی همگن در بین این جمعیت ها وجود دارد که عمدتاً به واسطه تغییر کاربری اراضی و از بین رفتن زیستگاه های طبیعی گونه از یکدیگر جدا شده اند. حفظ اندازه زیستگاه های موجود و جلوگیری از تخریب بیشتر آنها و همچنین ایجاد کریدورهای ارتباطی مناسب بین جمعیت های محصور شده به عنوان تدابیر مدیریتی جهت تضمین بقای جمعیت های محصور شده پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی

تکه تکه شدن زیستگاه،
ریزماهوره،
ژنتیک سیمای سرزمین،
ژنتیک حفاظت،
کریدور ارتباطی

مقدمه

رویکردهای متعددی برای تعیین تمایزات و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها مورد استفاده محققان قرار گرفته است. این روشها را می‌توان به طور کلی به دو دسته تقسیم کرد: رویکردهایی که نیاز به تعیین مرزهای جمعیت در ابتدای مطالعه دارند. متداول‌ترین این رویکردها بر پایه استفاده از متغیرهای آماری F استوار است که در سال توسط رایت^۱ ابداع شد (Wright 1969). متغیرهای آماری F از ضریب درون آمیزی برای محاسبه تفاوت‌های ژنتیکی و بررسی چگونگی تقسیم این تنوع ژنتیکی بین گروهها در سه سطح مختلف استفاده می‌کنند. اولین متغیر آماری F_{IS} است که میزان درون‌آمیزی بین افراد خویشاوند را نسبت به سایر افراد جمعیت محاسبه می‌کند. دومین متغیر آماری F_{ST} است که تحت عنوان شاخص تثبیت نیز شناخته می‌شود و با استفاده از این شاخص میزان تفاوت‌های ژنتیکی بین زیر جمعیت‌ها را برآورد می‌کنند. سومین متغیر آماری F_{IT} است که برآوردی کلی از میزان درون آمیزی در یک جمعیت را با محاسبه هتروزیگوسیتی افراد نسبت به کل جمعیت بدست می‌آورد.

دسته دوم رویکردهایی هستند که نیازی به تعیین واحدهای جمعیتی در ابتدای مطالعه ندارند و در نتیجه از بسیاری اشتباهات در تفسیر مرزهای جمعیت‌ها می‌کاهند. برنامه‌هایی که بر پایه استنباط بیزی^۲ به تعیین واحدهای همگن ژنتیکی می‌پردازند نظیر STRUCTURE، PARTITION و یا BAPS از این دسته هستند (Latch et al. 2006). استنباط بیزی رویکردی آماری است که در آن برای تعیین بهترین برآورد از یک متغیر تصادفی بر اساس داده‌های ورودی و ترکیب کردن آن با توزیع احتمال فرایند صورت می‌گیرد (Bernardo and Smith 1994). در استنباط بیزی، هدف این است که میزان عدم قطعیت در مورد مقدار حقیقی پارامتر با استفاده از احتمال توضیح داده شود و این احتمال میزانی برای عدم قطعیت در مورد آن پارامتر باشد. در نتیجه در استنباط بیزی فواصل احتمالی را برای پارامترهای ناشناخته ارائه می‌دهد که در برگرفته مقدار حقیقی پارامتر ناشناخته با احتمال ۹۵ درصد یا دیگر مقادیری که توسط کاربر تعریف شده است (Blasco 2001)

علاوه بر این، روش تجزیه و تحلیل بیزی این امکان را به وجود می‌آورد که اطلاعات اولیه یا پیشین^۳ نیز در تجزیه و تحلیل داده‌ها دخالت داده شوند که در سایر روش‌های مرسوم وجود ندارد و در نهایت احتمال پسین برای پارامتر ناشناخته محاسبه می‌شود. برنامه‌های STRUCTURE، PARTITION و BAPS از استنباط بیزی استفاده نموده و بر پایه اطلاعات ژنتیکی که دریافت می‌کنند به گروه‌بندی واحدهایی که حداکثر شباهت و همگنی ژنتیکی را دارند، می‌پردازند ولی توانایی استفاده از داده‌های مکانی و نقشه بندی واحدهای بدست آمده را ندارند. رویکرد ژنتیک سیمای سرزمین با استفاده از برنامه^۴ GENELAND که توسط (Guillot et al. 2008; 2012) ارائه شد، علاوه بر تعیین واحدهای همگن جمعیتی، نقشه مکانی ارائه می‌کند. در نتیجه امکان روی هم گذاری با نقشه‌های توپوگرافی، نقشه کاربری اراضی و غیره و ارزیابی عوامل موثر در شکل‌گیری ساختار ژنتیکی موجود فراهم می‌شود.

برنامه GENELAND یک برنامه آماری رایگان است که به صورت یک بسته در محیط نرم افزار R اجرا می‌شود. این برنامه کامپیوتری برای تحلیل آماری داده‌های ژنتیک جمعیت مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای استفاده از این برنامه نصب نرم افزار R بر روی کامپیوتر ضروری است. پس از بازکردن نرم افزار R باید از منوی install Packages برنامه را فراخوانی نمود. این برنامه نیازمند داده‌های ژنتیکی است که از مارکرهای چیره یا هم چیره نظیر ریزماهوره، AFLP، SNP و داده‌های تعیین ردیف بدست می‌آید. نسخه جدید (۲۰۱۲) این نرم افزار قادر است داده‌های ریختی را نیز در فایل جداگانه دریافت و به صورت تلفیقی با داده‌های ژنتیکی و اطلاعات جغرافیایی در تحلیل‌ها مورد استفاده قرار دهد (Guillot et al. 2012). داده‌های اولیه ورودی در اجرای یک پروژه در محیط برنامه مذکور شامل فایل متشکل از داده‌های ژنتیکی و فایل در برگرفته مختصات جغرافیایی هر یک از نمونه‌ها است. این برنامه بدین صورت عمل می‌کند که تک تک نمونه‌های موجود در یک مجموعه داده را بر اساس شباهت‌های ژنتیکی به شیوه خوشه‌بندی به گروه‌های همگن تبدیل می‌کند و براساس

³ Priori⁴ <http://www2.imm.dtu.dk/~gigu/Geneland/>¹ Wright² Bayesian inference

جمع‌آوری نمونه‌های مورد نیاز این پژوهش از طریق تله‌گذاری با استفاده از تله‌های قفسی انجام شد. از حیوانات گرفته شده با استفاده از قیچی ضدعفونی شده نمونه بافتی کوچکی از لاله گوش تهیه و جانور پس از نشانه‌گذاری در محل صید رها شد. نمونه بافت تهیه شده از هر فرد در ویال کوچکی حاوی اتانل ۷۰ درصد قرار داده شد و اطلاعات مربوط به جنس حیوان و محل جمع‌آوری روی آن ثبت شد. علاوه بر جمع‌آوری بافت، موقعیت جغرافیایی محل‌های نمونه‌برداری با استفاده از GPS ثبت شد. با استفاده از روش فوق ۹۲ فرد برای انجام تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی نمونه‌برداری شدند. استخراج ماده ژنتیکی از نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت جنترا^۱ و مطابق دستورالعمل داده شده توسط شرکت سازنده، صورت پذیرفت. مجموعه‌ای از نه ریزماهواره برای تعیین ژنوتیب افراد نمونه‌برداری شده استفاده شد. از بین این ریزماهواره‌ها، شش ریزماهواره اختصاصی گونه مذکور بوده (Brown et al. 2004) و سه عدد از آنها برای گونه همجنس آن (Millis 2000) طراحی شده بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر با استفاده از ۱۰۰ ng DNA، p ۲mol از هریک از آغازگرها که با استفاده از نشانگرهای فلورسانت نشانه‌گذاری شده بودند، یک واحد (1x) PCR بافر، ۰.۲ mM از مخلوط dNTP، ۲/۵ mM $MgCl_2$ و ۰/۱ واحد آنزیم پلیمرز Taq استفاده شد. چرخه‌های تکرارشونده با استفاده از روش touchdown PCR مطابق برنامه شرح داده شده در منابع مربوطه (Millis 2000; Brown et al. 2004) انجام گرفت. آل‌های موجود در هریک از نمونه‌ها در هر یک از ریزماهواره‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3730 DNA Analyser و سپس با استفاده از نرم افزار Genemapper V 2.1 استخراج شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

انحراف از موازنه هاردی وینبرگ^۲، عدم توازن همبستگی بین لوکوس‌ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (HO) و مورد انتظار (HE) برای هریک از جمعیت‌ها با استفاده از نرم افزار Popegene, v 1.32 (Yeh et al. 1997) محاسبه شد. جهت بررسی وضعیت ژنتیکی جمعیت‌ها، آمار توصیفی پارامترهای

طول و عرض جغرافیایی که از فایل داده‌های مکانی در اختیار دارد نقشه‌ای زمین مرجع با ترسیم خوشه‌های تعیین شده با رنگ-های مختلف در اختیار کاربر قرار می‌دهد. بنابراین برنامه به محقق کمک می‌کند که بتواند فاکتورهایی که بر جریان ژنی در بعد مکان اثر دارند را مشخص کند. خروجی‌های اصلی نرم افزار شامل یک نمودار است که تعداد جمعیت‌های برآورد شده (k) را نشان می‌دهد و یک نقشه که توزیع جغرافیایی جمعیت‌های مختلف را نشان می‌دهد. احتمال پسین محاسبه شده برای خوشه‌بندی نمونه-ها نیز به صورت یک جدول قابل ذخیره سازی می‌باشد (Storfer et al. 2006; Malekian 2008).

هدف از مقاله حاضر معرفی نرم افزار GENELAND در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت و آزمون کارایی آن در تعیین محدوده‌های جمعیتی در طبیعت با استفاده از داده‌های ژنوتیپی حاصل از نه ریزماهواره از یک پستاندار کیسه‌دار درختزی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

منطقه مورد مطالعه ۱۳ لکه جنگلی واقع در جنوب شرقی استرالایای جنوبی بین طول جغرافیایی ۳۷ درجه و ۳۰ دقیقه تا ۳۸ درجه جنوبی و عرض جغرافیایی ۱۴۰ درجه و ۲۵ دقیقه تا ۱۴۱ درجه شرقی گردآوری شده (Malekian 2007) می‌باشد (شکل ۱). در این منطقه جنگلهای طبیعی جهت فعالیت‌های کشاورزی، دامپروری و توسعه شهری قطع و پاکسازی شده‌اند. به طوری‌که تنها ۱۳ درصد پوشش گیاهی طبیعی منطقه باقی مانده است (Croft et al. 1999). این منطقه زیستگاه گونه‌های متعددی از پستانداران کیسه دار درختزی از جمله *P. breviceps* می‌باشد که از گونه‌های نادر و حفاظت شده می‌باشد (Carthew 2004). درحال حاضر گونه مذکور در منطقه در زیستگاههای طبیعی باقی مانده که عمدتاً کوچک و محصور شده توسط پدیده‌های انسان ساز زیست می‌کند و بدلیل قطعه قطعه شدن زیستگاه و تخریب آن توسط انسان با خطر نابودی روبروست (Le Duff 2000). داده‌های ژنتیکی و مکانی مورد نیاز

¹ Gentra DNA Extraction Kit (QIAGEN)

² Hardy-Weinberg equilibrium

ساختار جمعیتی استفاده شد نقشه‌ای مکانی بدست آمده با واقعیت زمین در در نرم افزار گوگل ارتس^۲ رویهم‌گذاری شد.

نتایج و بحث

انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی وینبرگ در سطح ۵ درصد در نه مکان استفاده شده در لکه‌های جنگلی نمونه‌برداری شده مشاهده نشد ($P = ۰/۶$). عدم توازن همبستگی بین لوکوس‌ها نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود ($P = ۰/۳۴$). به طور کلی ۵۷ آلل در مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده ثبت شد. تعداد آلل‌های ثبت شده در لوکوس‌های بررسی شده بین ۳ و ۱۱ ال متغیر بود. میانگین تنوع آللی لکه‌های جنگلی بین ۲/۶۶ و ۷/۴ آلل و میانگین هتروزیگوسیتی در حدود ۰/۶۶ برآورد شد. به طور کلی تفاوت معنی‌داری بین لکه‌ها از نظر تنوع آللی وجود داشت ($P=۰/۰۰۱$). ولی مقایسه غنای آللی ($F=۳/۴۹$) و هتروزیگوسیتی ($P=۰/۸۳$, $F=۰/۳۵$) معنی‌دار نبود. تنوع آللی و هتروزیگوسیتی در این گونه و در منطقه مطالعاتی در حد متوسط و در محدوده گزارش شده برای ۲۴ گونه کیسه‌دار دیگر مطالعه شده ($AD=۲/۸۷-۷/۴$; $H_E=۰/۵۶-۰/۷۱$) بدست آمد. اما متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این گونه از گونه‌هایی نظیر کوالا^۳ (Houlden et al. 1996) ($HO=۰/۲۳$) و وامبت^۴ ($HO=۰/۲۷$) (Taylor et al. 1994) که دچار بحران جمعیتی شده‌اند، بیشتر و در مقایسه با گونه‌ها و جمعیت‌های دست نخورده نظیر کانگرو خاکستری^۵ ($HO=۰/۸۶$) (Spencer et al. 1997) والابی‌های صخره زی^۶ ($HO=۰/۸۲$) (Zenger et al. 2003) کمتر ارزیابی شد. با وجود اینکه جمعیت‌های نمونه‌برداری شده در تعادل هاردی وینبرگ قرار داشته و تفاوت معنی‌داری از آن مشاهده نشد اما مقادیر مثبت ضریب درون‌آمیزی در نه جمعیت مشاهده شد. شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) برآورد شده برای نه جمعیت از ۱۳ جمعیت مطالعه شده مثبت و بین ۰/۰۰۷ و ۰/۱۳ متغیر بود. مقادیر مثبت شاخص مذکور می‌تواند نشانگر احتمال

ژنتیکی شامل تنوع آللی (تعداد آلل در هر جایگاه ژنی: AD) و غنای آللی (تعداد آلل در هر جایگاه ژنی که به نسبت جمعیت تصحیح شده باشد: AR) و میزان شاخص درون‌آمیزی (F_{IS}) در لکه‌های جنگلی نمونه‌برداری شده با استفاده از نرم افزار FSTAT (Goudet 2001) برآورد شد. آزمون معنی‌دار بودن شاخص درون‌آمیزی با استفاده از آزمون جایگشت یک با هزار تکرار در نرم افزار FSTAT انجام شد. در این آزمون مقدار F_{IS} با توزیع بدست آمده در اثر جایگشت آلل‌های هر نمونه در همه آلل‌ها در هر جمعیت پس از هزار بار مقایسه می‌شود.

از داده‌های ژنتیکی و اطلاعات جغرافیایی محل‌های نمونه‌برداری نمونه‌ها در نرم افزار GENELAND جهت برآورد تعداد گروه‌ها و وجود ارتباط ژنتیکی میان آنها و تولید نقشه‌های مکانی استفاده شد (Guillot et al. 2012). دو فایل شامل داده‌های مکانی (مختصات نقاط نمونه برداری) و داده‌های ژنتیکی (ژنوتیپ افراد) تهیه و برنامه در محیط R اجرا می‌شود و از زنجیره مارکوف-مونت کارلو^۱ جهت انجام شبیه‌سازی و تعیین تعداد گروه‌های همگن و ارایه نقشه توزیع مکانی آنها استفاده می‌کند. زنجیره مارکوف-مونت کارلو یک فرایند تصادفی گسسته در زمان است شامل سامانه‌ای که در هر مرحله حالت مشخصی دارد و به صورت تصادفی در هر مرحله تغییر می‌یابد. این سامانه برای نمونه‌برداری از توزیع‌های احتمال که مبنای آن ساختن یک زنجیره با ویژگی‌های مطلوب است مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از تعداد بسیار زیادی تکرار حالت ایجاد شده به عنوان نمونه ای از توزیع مطلوب استفاده می‌شود. تعداد تکرار در زنجیره مارکوف در این مطالعه ۱,۰۰۰,۰۰۰ و از هر ۱۰۰ تکرار یکی ذخیره شد که در نهایت ۱۰,۰۰۰ تکرار در استخراج احتمال صحت برآورد و تعیین نقشه مکانی نهایی استفاده شد. خروجی برنامه مذکور پس از انجام تحلیل‌ها، نمودار حداکثر تعداد گروه-های موجود در داده‌ها بر اساس همگنی درون هر گروه (شباهت ژنتیکی افراد) و نقشه مکانی چگونگی قرارگیری آنها بدست آمد. شکل ۲ مراحل اجرای برنامه را نشان می‌دهد. جهت بررسی ارتباط بین لکه‌های جنگلی و تحلیل عوامل موثر بر شکل‌گیری

² Google earth

³ Southern koala

⁴ Northern hairy-nosed wombat

⁵ Eastern gray kangaroos

⁶ Allied rock wallabies

¹ Markov chain Monte Carlo

وجود درون آمیزی و تولید مثل بین خویشان در جمعیت باشد. کمترین مقدار مثبت ضریب درون آمیزی ($0/007$) متعلق به لکه جنگلی شماره ۱۱ که بزرگترین منطقه از نظر اندازه می باشد که در مقایسه با لکه های کوچک تر مقدار شاخص چندین برابر کوچک تر است. آزمون معنی دار بودن این شاخص نشان داد که فقط در پنج جمعیت از نه جمعیت مذکور تفاوت در سطح ۵ درصد معنی دار بود (جدول ۱). برعکس مقادیر منفی آن نیز به واسطه زیادتار بودن هتروزیگوسیتی مشاهده شده از مقدار مورد انتظار بر اساس موازنه هاردی وینبرگ باشد (Pudovkin et al. 1996). برخلاف علل کمبود هتروزیگوسیتی در جمعیت ها، در مورد علل منفی بودن این ضریب مطالعات اندک است. معمولا F_{IS} منفی می تواند به علت کوچک بودن اندازه جمعیت تولید مثل کننده باشد. وقتی چند فرد تولید مثل کننده وجود دارد که در تولید نسل بعد مشارکت دارند ممکن است فراوانی اللی بین نرها و ماده ها متفاوت بوده و همچنین بدلیل کوچک بودن جمعیت به صورت تصادفی افراد هوموزیگوت تولید نشوند (Balloux 2004). غالبیت مضاعف^۱ هم می تواند دلیل دیگری برای منفی بودن این ضریب باشد (Ohta and Kimura 1970). در شرایط غالبیت مضاعف هتروزیگوسیتی در طول چرخه زیستی موجود و به واسطه انتخاب طبیعی که بر علیه ژن های مغلوب که در حال هوموزیگوت بودن به صورت کشنده ظاهر می شوند عمل کرده و کمبود افراد هوموزیگوت در جمعیت و در نتیجه هتروزیگوسیتی مازاد را سبب شود. در این مطالعه و با توجه به محصور بودن لکه های جنگلی در لندسکیپ تکه تکه شده و زیست شناسی بیولوژی گونه که قادر به گذشتن از موانع و زیستگاه های نامطلوب نیست (Le Duff 2000) ممکن است کوچک بودن اندازه جمعیت تولید مثل کننده دلیلی بر این امر باشد.

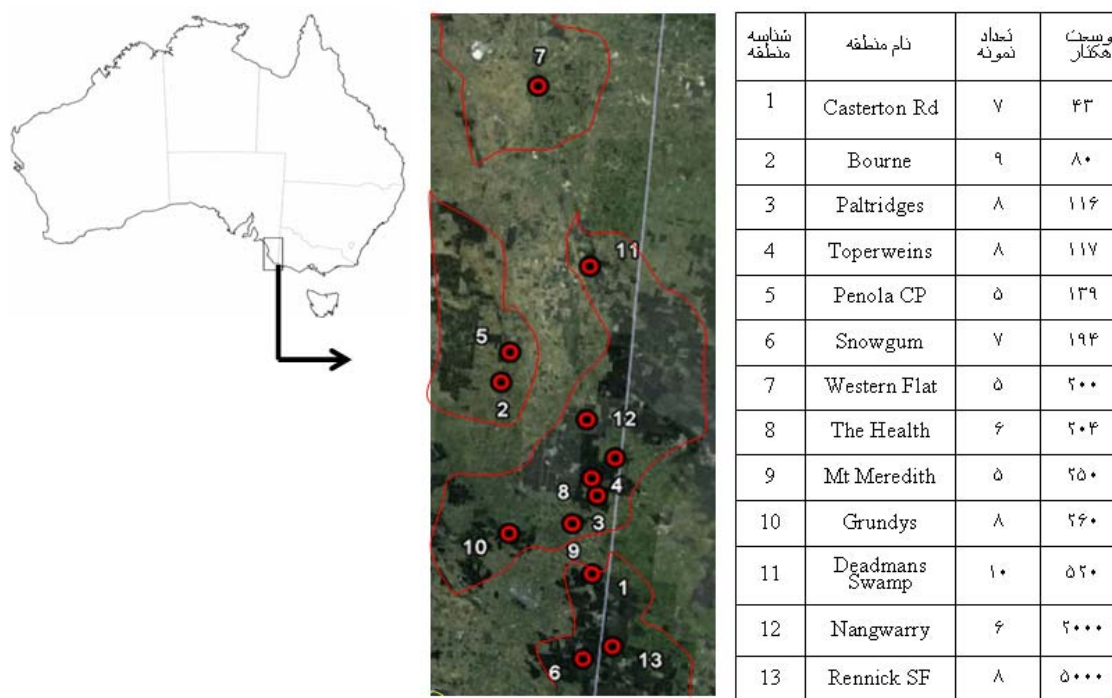
نتایج حاصل از تحلیل سیمای سرزمین در برنامه GENELAND حاکی از وجود چهار گروه همگن ($K=4$) در بین نمونه های جمع آوری شده از سایت های تحت بررسی داشت (شکل ۳). توزیع جغرافیایی لکه های جنگلی مطالعه شده و نحوه قرارگیری آنها در چهار گروه مذکور در شکل ۱ نشان داده شده است.

لکه جنگلی شماره ۷ در یک گروه، لکه های ۲ و ۵ یک گروه، لکه های نمونه گیری شده ۱۱، ۱۲، ۱۰، ۹، ۸، ۴، ۳ در یک گروه و سه لکه جنگلی ۱، ۱۳، ۶ به صورت یک گروه همگن طبقه بندی شدند (شکل ۱). روی هم گذاری لایه مکانی گروه های همگن بدست آمده با واقعیت زمین نشان داد که توزیع گروه ها منعکس کننده نحوه توزیع اراضی جنگلی طبیعی و جدا شدن مناطق از یکدیگر و محصور شدن آنها به واسطه تخریب و تبدیل زیستگاه های طبیعی به اراضی کشاورزی و یا جنگل های دست کاشت (عمدتا کاج) می باشد. لکه شماره ۷ به صورت یک منطقه جنگلی محصور شده در شمال منطقه مورد مطالعه واقع شده است که اراضی پیرامون آن را عمدتا زمین های کشاورزی و چراگاه های دام فراگرفته اند که امکان مهاجرت و تبادل ژنی افراد را محدود می کند و در نتیجه به مرور زمان تفاوت های ژنتیکی در آن بارز شده است و از مناطق جنوبی تر متمایز شده است. لکه های ۲ و ۵ نیز در در بخش غربی واقع شده و توسط اراضی کشاورزی و جنگل کاج جدا شده اند. گروه سوم که بیشترین تعداد لکه های جنگلی مورد مطالعه را در بر می گیرد عمدتا نواحی جنگلی طبیعی بوده و کم و بیش پیوسته بوده که امکان ارتباط مهاجرت و مخلوط شدن ال های افراد ساکن در این مناطق را فراهم می آورد. گروه آخر که در بخش جنوبی منطقه مورد مطالعه واقع شده است بر گیرنده سه منطقه شامل یک لکه جنگلی بزرگ با وسعت ۵۰۰۰ هکتار و دو لکه کوچک است که احتمالا بدلیل نزدیکی و اتصال به منطقه بزرگ تر (منطقه بزرگ به عنوان منبع و لکه کوچک مخزن عمل نموده) افراد قادر به جابجایی و تبادل ژنی بوده به همین دلیل با وجود کوچک بودن دو لکه دیگر اثر رانش ژنتیکی و درون آمیزی کاهش یافته است. این نتایج نشان می دهد که احتمالا جریان ژنی که بین جمعیت هایی که در فواصل جغرافیایی نزدیک قرار دارند باعث همگن شدن ال های موجود در این جمعیت ها شده است. در مقابل در جمعیت هایی کوچک و جدا افتاده از سایر جمعیت ها، امکان این تبادلات ژنتیکی وجود نداشته و این جمعیت ها با گذشت زمان از سایر جمعیت ها متفاوت می شوند.

¹ Over-dominance

جدول ۱- نتایج تجزیه و تحلیل ژنتیکی گونه مورد مطالعه در ۱۳ لکه جنگلی (تنوع آلی AD، غنای آلی AR، هتروزیگوسیتی مشاهده شده H_0 ، هتروزیگوسیتی مورد انتظار H_e و ضریب درون آمیزی (F_{IS}) و مقادیر احتمال درون آمیزی)

شناسه منطقه	نام منطقه	H_e	H_0	AD	AR	F_{IS}	P
۱	Casterton Rd	۰/۵۷	۰/۶۵	۳/۸	۳/۳	-۰/۱	۰/۹
۲	Bourne	۰/۶۶	۰/۶۵	۵/۶	۳/۸	۰/۰۶	*۰/۰۱۷
۳	Paltridges	۰/۷۲	۰/۷۴	۶/۳	۴/۱	۰/۰۹	*۰/۰۴
۴	Toperweins	۰/۷۱	۰/۶۹	۶/۳	۴/۱	۰/۱۳	*۰/۰۲
۵	Penola CP	۰/۶۶	۰/۸۳	۳/۸	۳/۸	-۰/۱۳	۰/۹
۶	Snowgum	۰/۶۴	۰/۶۶	۵	۳/۷	۰/۰۷	۰/۱۳
۷	Western Flat	۰/۶۶	۰/۷۹	۳/۷	۲/۲	۰/۰۱	۰/۵۶
۸	The Health	۰/۶۸	۰/۶۶	۴/۴	۳/۶	۰/۰۳	۰/۳۳
۹	Mt Meredith	۰/۵۶	۰/۷۱	۲/۶	۲/۸	-۰/۰۸	۰/۷۷
۱۰	Grundys	۰/۷۱	۰/۶۵	۵/۱	۳/۷	۰/۰۲	*۰/۰۳۵
۱۱	Deadmans Swamp	۰/۶۹	۰/۶۷	۷/۴	۴	۰/۰۷	*۰/۰۳
۱۲	Nangwarry	۰/۶۴	۰/۷۸	۲/۶	۳/۳	-۰/۱۶	۰/۵
۱۳	Rennick SF	۰/۷۱	۰/۷۳	۶/۸	۴/۱	۰/۰۰۷	۰/۹



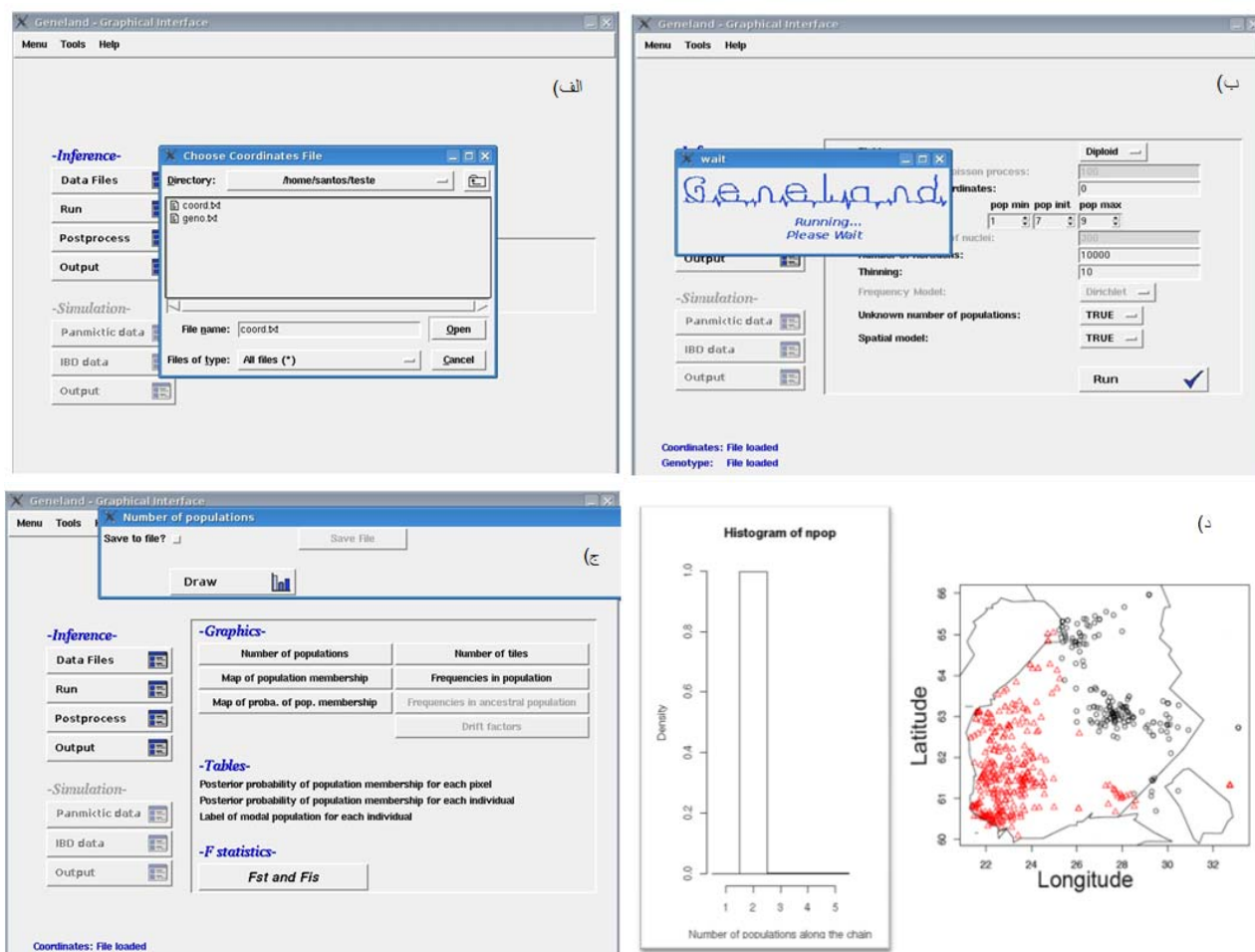
شکل ۱- موقعیت جغرافیایی منطقه مطالعاتی و سیزده لکه جنگلی نمونه برداری شده، وسعت لکه جنگلی و تعداد نمونه در هر یک از لکه‌ها. توزیع جغرافیایی چهار جمعیت همگن برگزیده شده توسط برنامه GENELAND پس از روی هم گذاری با نقشه عوارض زمین در نرم افزار گوگل ارتس را نشان می‌دهد.

انتخاب طبیعی یا رانش ژنتیکی امکان و زمان لازم را نداشته‌اند تا بروز نمایند و ممکن است به واسطه عدم نشان دادن تفاوت مورد توجه حفاظتی قرار نگیرند. یا در شرایطی که با استفاده از روش‌های معمول مانند مقایسه مقادیر F_{ST} ساختار ژنتیکی مشهود نیست ممکن است مدیران عرصه حفاظت گمراه شوند که تخریب و تکه تکه شدن زیستگاه تأثیری نداشته و جمعیت‌ها به صورت پیوسته عمل می‌کنند و تبادل و جریان ژنی برقرار است.

تحلیل داده‌های حاصل از ۱۰ ریزماهواره از ۵۰۰ فرد گراز ماهی ساحلی (*Phocoena phocoena*) نشان داد که افرادی که توسط برنامه STRUCTURE همگی به یک خوشه منتسب شده بودند در این برنامه به دو گروه شامل جمعیت‌های شرق اقیانوس اتلانتیک شمالی و مرکز آن تقسیم شدند. دمای سطح آب و تولید اولیه فاکتورهای مهم در حضور این گونه می‌باشد (Fontaine et al. 2007). در گونه تهدید شده جی جاق فلوریدا (*Aphelocoma coerulescens*) استفاده تلفیقی از ۱۰ لوکوس ریزماهواره و مدل مکانی بیزی نحوه پراکنش آنها را در مقیاس لندسکیپ نشان داد. ۱۰ گروه همگن در محدوده پراکنش این گونه وجود دارد (Coulon et al. 2008). این گروه‌ها تقریباً با فراجمعیت‌هایی که مطالعات اکولوژیک مشخص کرده بود همپوشانی نشان داد. نتایج کدکور نشان می‌دهد که این پرند با وجود برخورداری از قدرت پرواز کمتر تمایل به پراکنش داشته و جدایی و محصور شدن جمعیت‌ها ممکن است به نابودی گونه و فرسایش ژنتیکی آن بیانجامد (Koenig and Walters 2008). برخی از گروه‌های همگن تعیین شده ژنتیکی مشتمل بر دو یا چند فراجمعیت اکولوژیک بودند که این نشان‌دهنده تخریب زیستگاهی است که در سال‌های اخیر به واسطه فعالیت‌های انسانی در زیستگاه اتفاق افتاده است و جمعیت‌ها به لحاظ فیزیکی جدا شده‌اند و با توجه به پراکنش اندک این گونه در آینده نزدیک تفاوت‌های ژنتیکی بروز خواهد کرد. بنابراین مدیریت فعال برای حفظ این گونه ارزشمند با ایجاد کریدورهای زیستگاهی و جلوگیری از تخریب و محصور شدن بیشتر جمعیت‌ها توصیه می‌شود. مدیریت فعال برای حفظ ذخایر ژنتیکی و جلوگیری از فرسایش ژنتیکی لازم

برنامه GENELAND جهت مطالعه الگوی جریان ژنی در هفت گونه ماهی ساحلی در مدیترانه غربی مورد استفاده قرار گرفت (Galarza et al. 2009). نتایج وجود دو گروه ژنتیکی همگن را در بین تمام مناطق نمونه‌برداری شده نشان داد در صورتی که با توجه به پیوستگی محیط دریا و امکان تبادل ژنی وجود ساختار و تفاوت‌های ژنتیکی در این جمعیت‌ها متصور نبود. نقشه مکانی توزیع جمعیت‌ها نشان‌دهنده تأثیر دو جبهه جریان آبی که حاصل برخورد آب سبک اقیانوس اتلانتیک و آب سنگین مدیترانه هستند جریان اقیانوسی را پدید می‌آورند که به عنوان مانعی بر پراکنش این گونه‌ها و امکان جابه‌جایی و تبادل ژنتیکی آنها موثرند. در مطالعه‌ای با استفاده از نشانگر SNP به بررسی ساختار جمعیت انسانی در دو کشور فنلاند و سوئد پرداخته و استفاده از این نرم افزار توانسته‌اند سه گروه همگن شامل سوئد، شرق فنلاند و غرب فنلاند را جدا کنند (Hannelius et al. 2008). این مطالعه نشان داد که در شرایطی که شباهت‌های بین جمعیت زیاد است و مقدار F_{ST} جمعیت‌ها اندک است به کارگیری برنامه GENELAND که داده‌های مکانی را با داده‌های ژنتیکی به صورت تلفیقی به کار می‌گیرد به یافتن ساختار جمعیتی کمک می‌کند.

تأثیر مشخصه‌های سرزمین بر ساختار جمعیتی گورن شوکا در یک چشم‌انداز تکه تکه شده با استفاده از داده‌های ریزماهواره سنجیده شد. داده‌ای حاصل از مقایسه F_{ST} در این جمعیت‌ها نشان داد که جمعیت‌ها تفاوت‌های بسیار اندکی داشته (۰/۰۰۸) و تمایز آنها از یکدیگر کم است. با تلفیق داده‌های ژنتیک با داده‌های مولکولی در مقیاس سرزمین نشان داد که می‌توان با در نظر گرفتن موانع موجود دو گروه همگن را شناسایی و متمایز نمود (Coulon et al. 2006). در این مطالعه از نرم افزار STRUCTURE نیز استفاده شده که فقط یک جمعیت جدا شد. این رویکرد توانست تمایز اندک اما معنی‌دار در جمعیت‌های موجود را مشخص نماید. این نشان می‌دهد که این برنامه قادر است وجود ساختار ژنتیکی هرچند اندک را در مقیاس خرد شناسایی کند. این امر از دیدگاه مدیریت جمعیت‌ها بسیار مهم است. به عنوان مثال در مورد جمعیت‌هایی که به تازگی از یکدیگر جدا شده و یا به تازگی در یک محل استقرار یافته‌اند و هنوز تفاوت‌های ژنتیکی به واسطه



شکل ۲- مراحل وارد سازی داده‌ها (الف) اجرای برنامه (ب) پنجره داده‌های خروجی جهت نمایش (ج) و خروجی برنامه (د).

ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها در مقیاس محلی می‌تواند در ارزیابی و الویت‌بندی آنها و تدوین استراتژی‌های حفاظتی نقش مهمی داشته باشد.

در این مطالعه ساختار ژنتیکی گونه‌ای کیسه‌دار درختی در یک زیستگاه تکه تکه شده مورد تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌های مذکور و ساختار ژنتیکی مشتمل بر ۴ گروه قابل شناسایی است. از آنجا که گونه مورد مطالعه گونه‌ای درختی و وابسته به جنگل می‌باشد و توانایی استفاده از زمین برای جابجایی بین زیستگاه‌ها را نداشته، در مدیریت جمعیت‌های مذکور باید به بهم پیوستگی زیستگاه‌های جنگلی توجه ویژه‌ای مبذول داشت. ایجاد راهروهای ارتباطی بین

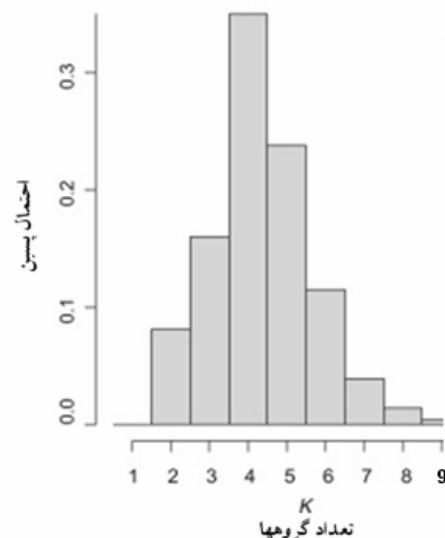
است و بتوان جمعیت‌های ایزوله را به یکدیگر متصل نمود و فرسایش ژنی را کاهش داد. در مطالعه دیگری از این برنامه جهت برآورد میزان تبادل ژنی موجود بین جمعیت‌های طوطی روزلا (*Platycercus elegans*) در استرالیا و همچنین ساختار ژنتیکی این جمعیت‌ها در گذشته و حال که سابقه طولانی تکاملی دارنده استفاده شد. نتایج نشان داد که گرچه سه گروه قابل تمایز هستند و اثر انتخاب طبیعی و رانش ژنی به ایجاد جمعیت‌های متفاوت در درون این گونه منجر شده است (Joseph et al. 2008).

نتیجه‌گیری

هدف نهایی در مدیریت و حفاظت از جمعیت‌ها حفظ تنوع ژنتیکی آنها برای تداوم حیات آنها و حفظ توانایی سازگاری تکاملی آنها در شرایط متغیر محیط است. داشتن اطلاعات دقیق از

منابع

- Balloux F (2004) Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. *Evolution* 58: 1891-1900.
- Bernardo J M, Smith AFM (1994). *Bayesian Theory*. New York, Wiley Pub.586.
- Blasco A (2001) The Bayesian controversy in animal breeding. *Journal of Animal Sciences* 79: 2023-2046.
- Brown M, Kendal TA, Cooksley H, Saint KM, Taylor AC, Carthew SM, Cooper SJB (2004) Polymorphic microsatellite markers for the gliding marsupials *Petaurus australis* and *Petaurus breviceps*. *Molecular Ecology Notes* 4: 704-706.
- Carthew SM (2004) Distribution and conservation status of possums and gliders in South Australia. *The Biology of Australian Possums and Gliders*. Goldingay RL, Jackson, SM. New South Wales, Australia, Surrey Beatty and Sons. 63-70.
- Coulon A, Fitzpatrick JW, Bowman R, Stith BM, Makarewicz CA, Stenzler LM, Lovette IJ (2008) Congruent population structure inferred from dispersal behaviour and intensive genetic surveys of the threatened Florida scrub-jay (*Aphelocoma coerulescens*). *Molecular Ecology* 17: 1685-1701.
- Coulon A, Guillot G, Cosson JF, Angibault JM, Aulagnier S, Cargnelutti B, Galan M, Hewison AJ (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology* 15: 1669-1679.
- Croft T, Carruthers S, Possingham HP, Inns B (1999) Biodiversity plan for the southeast of South Australia, research Report, Department for Environmental Heritage and Aboriginal Affairs, South Australia.
- Fontaine M, Baird S, Piry S, Ray N, Tolley K, Duke S, Birkun A, Ferreira M, Jauniaux T, Llavona A, Ozturk B, A Ozturk A, Ridoux V, Rogan E, Sequeira M, Siebert U, Vikingsson G, Bouqueneau JM, Michaux J (2007) Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. *BMC Biology* 5: 30.
- Galarza JA, Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M, Roques S, Turner GF, Rico C (2009) The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 1473-1478.
- Goudet J (2001) Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices; available at URL: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. 2.9.3. from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Guillot G, Renaud S, Ledevin R, Michaux J, Claude J (2012) A unifying model for the analysis of phenotypic, genetic and geographic data. *Systematic Biology* doi: 10.1093/sysbio/sys038.
- Guillot G, Santos F, Estoup A (2008) Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24: 1406-1407.



شکل ۳- تعداد گروه‌های همگن (K). تعداد چهار گروه در اینجا حداکثر احتمال را داشته و حداکثر تعداد گروه همگن در نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد.

لکه‌ها با پوشش گیاهی مناسب و قابل استفاده باید مورد توجه قرار گیرد. برنامه GENELAND در مقایسه با سایر روش‌های متداول در ژنتیک جمعیت مزایایی دارد. مهمترین مزیت آن عدم نیاز به تعیین مرزهای جمعیت در ابتدای مطالعه است که همین امر از بسیاری اشتباهات در تفسیر مرزهای جمعیت‌ها می‌کاهد. علاوه بر این تولید لایه مکانی، امکان روی هم‌گذاری با واقعیت زمین و بررسی تاثیر عوارض زمین بر ساختار ژنتیکی را میسر می‌سازد. در این پژوهش نمونه‌های جمع آوری شده از لکه‌های جنگلی به چهار گروه همگن تبدیل شدند که این امر نشانگر وجود ارتباطات و تبادل ژنی بین لکه‌های مجاور و نزدیک یکدیگر است. این جریان ژنی احتمالاً باعث همگن شدن آلل‌های موجود در این جمعیت‌ها شده است. در مقابل در لکه‌هایی کوچک و جدا افتاده، امکان این تبدلات ژنتیکی وجود نداشته و این جمعیت‌ها با گذشت زمان از سایر جمعیت‌ها متفاوت می‌شوند. بنابراین ایجاد کوریدورهای ارتباطی بین لکه‌ها با پوشش گیاهی مناسب و قابل استفاده به عنوان راهکارهای مدیریتی مناسب جهت حفظ تنوع ژنتیکی پیشنهاد می‌شود.

- Hannelius U, Salmela E, Lappalainen T, Guillot G, Lindgren C, von Dobeln U, Lahermo P, Kere J (2008) Population substructure in Finland and Sweden revealed by the use of spatial coordinates and a small number of unlinked autosomal SNPs. *BMC Genetics* 9: 54.
- Houlden BA, England PR, Taylor AC, Greville WD, Sherwin WB (1996) Low genetic variability of the koala *Phascolarctos cinereus* in south-eastern Australia following a severe population bottleneck. *Molecular Ecology* 5: 269-281.
- Joseph L, Dolman G, Donnellan S, Saint KM, Berg ML, Bennett ATD (2008) Where and when does a ring start and end? Testing the ring-species hypothesis in a species complex of Australian parrots. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 2431-2440.
- Koenig WD, Walters EL (2008) A tale of two worlds: molecular ecology and population structure of the threatened Florida scrub-jay. *Molecular Ecology* 17: 1632-1633.
- Latch E, Dharmarajan G, Glaubitz J, Rhodes O (2006) Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetics* 7: 295-302.
- Le Duff M (2000) An investigation into the impact of native habitat fragmentation on the marsupial sugar glider (*Petaurus breviceps*) and other arboreal marsupials in the south east of South Australia. Department of Applied and Molecular Ecology, University of Adelaide, Australia.
- Malekian M (2007) The effect of habitat fragmentation on genetic diversity and population structure in the fragmented landscape of south- eastern of South Australia. The 5th National Biotechnology Congress of Iran, CD publication, Tehran, Iran . (In Farsi).
- Malekian M (2008) Landscape genetics: Using landscape features to understand population structure. The Proceeding of the 10th Iranian Genetics Congress, pp 351, Tehran, Iran (In Farsi).
- Millis AL (2000) Isolation and characterization of microsatellite loci in marsupial gliders (*Petaurus norfolcensis*, *P. breviceps* and *P. gracilis*). *Molecular Ecology* 9:1681-1683.
- Ohta T, Kimura M (1970) Development of associative overdominance through linkage disequilibrium in finite populations. *Genetical Research*, 16: 165-177.
- Pudovkin AI, Zaykin DV, Hedgecock D (1996) On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. *Genetics* 144: 383-387.
- Spencer PBS, Adams M, Marsh H, Miller DJ, Eldridge MDB (1997) High levels of genetic variability in an isolated colony of rock-wallabies (*Petrogale assimilis*): evidence from three classes of molecular markers. *Australian Journal of Zoology* 45: 199-210.
- Storfer A, Murphy MA, Evans JS, Goldberg CS, Robinson S, Spear SF, Dezzani R, Dellmela E, Vierling L, Waits LP (2006) Putting the landscape in landscape genetics. *Heredity* 98: 128-142.
- Taylor AC, Sherwin WB, Wayne RK (1994) Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species, the northern hairy-nosed Wombat *Lasiorhinus krefftii*. *Molecular Ecology* 3: 277-290.
- Wright S (1969) Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 2. The Theory of Gene Frequencies. Chicago, University of Chicago Press, USA, 520.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T, Ye ZH, Mao JX (1997) POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. University of Alberta, Canada, Molecular Biology and Biotechnology Centre.
- Zenger KR, Eldridge MDB, Cooper DW (2003) Intraspecific variation, sex-biased dispersal and phylogeography of the eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*). *Heredity* 91: 153-162.