

## ارزیابی قابلیت کاربرد دمای ذوب محصولات PCR ژن‌های مورد استفاده در بررسی‌های

### فیلولوژنتیکی به منظور شناسایی تاکسون‌های مارها

لیلا مرادی جعفری، سکینه کاظمی نورعینی\*، اسکندر رستگار پویانی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

\*مسئول مکاتبات: Kazemibio@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۳

#### چکیده

دئوکسی ریبونوکلیئیک اسید (DNA) مولکولی است که دستورالعمل‌های ژنتیکی مورد استفاده در توسعه و عملکرد همه موجودات زنده شناخته شده را رمزگذاری می‌کند و برای ذخیره سازی اطلاعات بیولوژیکی بسیار مناسب است. امروزه، توالی-های DNA منابعی برای شناسایی گونه‌ها و روابط فیلولوژنتیکی آن‌ها هستند. علی‌رغم فن‌آوری‌های نوین شامل تعیین توالی نسل جدید و DNA بارکدینگ، هنوز نیاز به یک روش سریع، ارزان و قابل اعتماد برای شناسایی گونه‌ها به ویژه در ارگانسیم‌های تعریف شده که از لحاظ مورفولوژی دارای موارد ابهام هستند، وجود دارد. در این مطالعه، به بررسی اینکه آیا برخی از خواص شیمیایی بیوفیزیکی محصولات PCR مانند نقطه ذوب قبل از تعیین توالی می‌توانند برای شناخت هویت نمونه‌های مورد علاقه استفاده شوند، پرداخته شد. تعیین دمای ذوب محصولات PCR در بین اکثر روش‌های آزمایشگاه‌های زیست‌شناختی مولکولی در دسترس است. این مطالعه بر استفاده از بالقوه از دمای ذوب (Tm) محصولات PCR ژن‌های 16S و Cyt b (ژن‌های پرکاربرد در مطالعات فیلولوژنتیکی) با استفاده از دستگاه real-time PCR برای شناسایی گونه‌های مختلف مارها از ایران متمرکز شده است. نتایج اولیه از این دو ژن امیدوارکننده است اگرچه برای ارتقای حساسیت آن نیازمند مراحل تکمیلی می‌باشد. توسعه این روش می‌تواند در یک ارزیابی سریع تعیین گونه کاربرد داشته باشد.

کلمات کلیدی: دمای ذوب، فیلولوژی مولکولی، مارها ژن سیتوکروم b، ژن 16S.

#### مقدمه

شاخص تشابه ژنتیکی برای تخمین ارتباط بین افراد در درون جمعیت استفاده شده است. در سطح DNA انواع تنوع ژنتیکی وجود دارد که برای شناسایی گونه‌های جانوری مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای ۲۵۰ سال گذشته شناسایی گونه‌ها مبتنی بر ویژگی‌های مورفولوژیکی با برخی از عدم وابستگی همراه بود، با این حال امروزه DNA بارکدینگ یک هدف طلایی برای ایجاد سهولت و اعتماد به

برای شش دهه‌ی اخیر تئوری غالب تکامل، تئوری نئوداروینیسم است (۱۰). نظریه مدرن داروین معتقد است که انتخاب طبیعی باعث تغییر در مورفولوژی، فیزیولوژی، ژنتیک و غیره می‌شود (۳) که به نوبه خود مبنایی برای توسعه روش‌های شناسایی گونه‌ها با سطوح مختلف عدم قطعیت فراهم می‌کند (۷). در بسیاری از مطالعاتی که تنوع ژنتیکی چندین جمعیت درون گونه را توصیف می‌کنند، از فاصله ژنتیکی و



ریبوزومی هسته‌ای (srRNA) از پرکاربردترین‌ها است که به دلیل حضور و میزان تحول و تکامل آهسته، وجود آن در همه‌جا و در دسترس بودن اطلاعات از بسیاری نماینده‌های گونه یوکاریوتی می‌باشد (۸). در بسیاری از مطالعات استفاده از نشانگرهای مولکولی از جمله DNA میتوکندری (۲۹/۸٪) و DNA ریزماهواره هسته‌ای (۴۲/۵٪) کلاس‌های غالب هستند. مهم‌ترین محدودیت استفاده از اطلاعات mtDNA در تعریف گونه گرایش جریان ژن غیر مادری (در مواردی که وراثت mtDNA مادری است) بین گونه‌ای است (۱۳).

از طرفی DNA میتوکندری دارای ساختار ساده، وزن مولکولی کوچک، وراثت مادری، نوترکیبی نادر و نرخ جهش بالا می‌باشد (۹).

امروزه تعدادی از ژن‌های هسته‌ای و ژنوم میتوکندریایی مانند cytochrome b, 12S rRNA و 16S rRNA از ابزارهای مهم در زمینه‌های مختلف مربوط به مطالعه تکامل حیوانات، مانند تکامل جغرافیایی، ژنتیک جمعیت و فیلوژنتیک می‌باشد (۳، ۱۵). ژن سیتوکروم b دارای نواحی‌ای است که از لحاظ سرعت تکاملی با هم متفاوتند، در نتیجه نواحی از این ژن حفظ شده‌تر و نواحی دیگر آن متغیرتر است (۴). بنابراین سیتوکروم b یک ژن کد کننده پروتئینی مهم برای مطالعات تکامل فیلوژنتیک و طبقه بندی گونه‌ها وجود دارد (۹).

توالی‌های rRNA و به‌ویژه ژن 16S rRNA در حال حاضر اهمیت بالایی در مطالعه تکامل باکتریایی دارد و به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک ساعت مولکولی برای تخمین روابط بین باکتری‌های ناشناخته در سطح جنس یا گونه و همچنین مطالعات نژادی جانور یا گیاه استفاده می‌شود (۱۲، ۱۶). به دلایلی از جمله حضور جهانی این ژن در انواع گونه‌های جانداران، اجازه‌ی تعیین و تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیک در

تاکسونومی مولکولی است (۱، ۳). همه روش‌ها برای شناسایی گونه‌هایی که بر پایه تجزیه و تحلیل توالی DNA یا پروتئین می‌باشند بر فرض خنثی بودن تئوری تکامل مولکولی است که در آن دودمان‌های مختلف و اگر در طول زمان تکامل با تجمع تغییرات مولکولی که بسیاری از آن‌ها خنثی هستند جمع‌آوری می‌شود (۱۳).

روش‌هایی که در حال حاضر علاوه بر مورفولوژی برای شناسایی گونه‌ها به‌کار برده می‌شوند عبارتند از: هیبریداسیون، تعیین توالی DNA، تعیین نقشه‌ی جایگاه محدودکننده، تعیین قطعات کروموزومی، تعیین توالی آمینواسید و روش‌های ایمینولوژیکی. در همه‌ی این روش‌ها گونه‌های نزدیک درصد بالاتری از هیبریداسیون، نقشه‌ی محدودکننده‌ی بسیار مشابه و توالی‌های پروتئینی و DNAی مشابه تری را نشان می‌دهند و همچنین در روش‌های ایمینولوژیکی، آنتی‌بادی‌ها گونه‌های نزدیک را شناسایی می‌کنند اما گونه‌های خویشاوند دور را شناسایی نمی‌کنند (۲). در تاکسونومی مولکولی، می‌توان هر دوی DNA و RNA را بررسی کرد (۵، ۱۷) که آزمایشات DNA محبوب‌ترین روش‌ها برای شناسایی گونه‌ها است و دارای انواع ویژگی‌های مولکولی است (۱۹).

از جمله‌ی ویژگی‌های مولکولی می‌توان به توالی DNA، نسبت GC و هیبریداسیون اسیدنوکلئیک اشاره کرد. نسبت GC معمولاً حداقل مقدار در ویژگی‌های کلی تاکسونومی یک ارگانسیم است چون دو ارگانسیم می‌توانند میزان یکسانی GC داشته و در عین حال از نظر تاکسونومیک و فیلوژنتیک غیرمرتبط باشند. تکنیک‌های مولکولی در زمینه زیست‌شناسی به ما کمک کرده که رابطه ژنتیکی بین اعضای دسته‌های مختلف تاکسونومی را فراهم کنیم (۱۷). از تمام مولکول‌های موجود که با آن به مطالعه تکامل یوکاریوتی می‌پردازند، ژن RNA زیر واحد کوچک

**استخراج DNA ژنومی:** قطعاتی از بافت‌های عضله و یا کبد نمونه‌ها به عنوان منبع DNA جدا شده و تا انجام کارهای آزمایشگاهی در تیوب‌های حاوی الکل مطلق در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده‌اند. استخراج DNA با روش بسیار ارزان و ساده نمکی صورت گرفت (۶).

**تکثیر ژن‌ها به روش PCR و ارزیابی دمای ذوب:** پرایمرهای اختصاصی برای 16 S و سیتوکروم b توسط Bioneer, South Korea سنتز شدند. توالی‌های مورد استفاده و شرایط PCR در جدول ۲ آورده شده است. PCR بر روی ۱۰ نانوگرم DNA هر نمونه با استفاده از کیت PCR master mix 2X (GenetBio, South Korea) و افزودن ۱۰ پیکومول از هر پرایمر در تیوب‌های ۰/۲ در دستگاه Corbet PalmCycler PCR انجام شد. برای اندازه‌گیری دمای ذوب محصولات PCR به هر تیوب رنگ 0.75× SYBR Green I اضافه و فلورسانس نمونه‌ها در حالیکه دما به صورت پلکانی از دمای ۳۰ تا ۹۹ درجه سانتی‌گراد یک درجه در هر دقیقه افزایش می‌یافت توسط دستگاه اندازه‌گیری و ثبت می‌شود. مقدار دمای ذوب ( $T_m$ ) با تجزیه و تحلیل منحنی  $dF/dT$  حاصل برای هر نمونه اندازه‌گیری شد. برای اطمینان از تک باند بودن محصولات PCR الکتروفورز ۳ میکرولیتر از هر نمونه در ژل آگارز ۱ درصد انجام شد.

**آنالیز آماری داده‌ها:** داده‌های حاصل با دو روش مورد آنالیز قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده از دمای ذوب نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و تحلیل ممیزی (D.A) انجام شد. شناسایی نمونه‌های مجهول که در بخش نتایج ارائه شده اند بر اساس نمودارها و تحلیل‌ها انجام شده است. همچنین آنالیز دیگری انجام شد به این شرح که نقشه‌ای تهیه شد که در آن موقعیت مکانی هریک از گونه‌ها با نقطه ای با طول x

بین گونه‌های دور را می‌دهد اگرچه مناطق بسیار متغیر (تنوع درون‌گونه‌ای 16 S rRNA) می‌تواند یک محدودیت در پروژه‌ها باشد (۲۰). ما در این تحقیق قصد داریم امکان استفاده از برخی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی مانند دمای ذوب ( $T_m$ ) DNA ژن‌های میتوکندریایی Cyt b و 16S برای شناسایی گونه‌ها را بررسی کنیم. در واقع دمای ذوب DNA دورشته به‌عنوان دمایی تعریف شده است که نیمی از مولکول‌های اسید نوکلئیک دو رشته و نیم دیگر تک رشته هستند (انتقال از حالت دو رشته‌ای به حالت رندوم کوئل) (۱۸). تجزیه و تحلیل دمای ذوب محصول PCR در ترکیب با PCR Real-Time اولین بار با Light Cyclers توسط Wittwer و همکارانش در سال ۱۹۹۷ معرفی شد. این روش بر خلاف بسیاری از تکنیک‌های تجزیه و تحلیل DNA، نیاز به هیچ پردازش یا جداسازی ندارد (۲۱).  $T_m$  محصولات PCR یک تبدیل متریک است، و تنها یک نقطه روی منحنی ذوب را نشان می‌دهد. اطلاعات بیشتر در منحنی ذوب کامل شده با استفاده از  $T_m$  بدست می‌آید (۱۴). در صورت عدم وجود عوامل بی‌ثبات کننده مانند اوره و یا فرم‌امید،  $T_m$  الیگونوکلئوتید به چند فاکتور بستگی دارد: غلظت الیگونوکلئوتید، غلظت نمک، توالی بازی الیگونوکلئوتید، طول رشته الیگونوکلئوتید، عدم وجود تکثیرهای غیر اختصاصی (۱۱).

#### مواد و روش‌ها

**نمونه مارهای مورد مطالعه:** نمونه‌هایی از گونه‌های مختلف مارهای سمی و نیمه‌سمی ایران که در آزمایشگاه جانورشناسی دانشگاه حکیم سبزواری مورد شناسایی قرار گرفته بودند، مطابق جدول شماره ۱ در اختیار قرار گرفت. جمعیت مورد مطالعه از هر گونه شامل تعداد ۳ تا ۷ نمونه بود.



گونه و بدون همپوشانی با سایر گونه‌ها بود. نمونه‌های مجهول با استفاده از مقادیر دمای ذوب ژن‌های 16S و Cytb که کمیت‌های x و y و موقعیت مکانی مربوطه در نقشه را مشخص می‌کند و با توجه به فاصله احتمالی آن از نقاط معلوم، مورد شناسایی قرار گرفتند.

و عرض y نشان داده می‌شود که x و y به ترتیب معادل میانگین دمای ذوب محصولات PCR ژن‌های 16S و Cytb بدست آمده از نمونه‌های مربوط به جمعیت گونه‌ای مورد نظر است. با توجه به مقادیر میانگین x و y و انحراف معیار آنها موقعیت‌های مکانی بدست آمده برای اکثر گونه‌ها خاص همان

جدول ۱- اسامی گونه‌های سمی و نیمه‌سمی مارهای مورد استفاده

مارهای سمی	ERP
<i>Gloydius halys caucasicus</i>	3510- 3511- 3517- 3516- 2189-2188
<i>Macrovipera lebetina</i>	975- 986- 1741- 1941- 2523-2376- 3685
<i>Naja oxiana</i>	098- 3101- 3720- 3719
<i>Pseudocerastes persicus</i>	3379- 3383- 3389- 3396- 3402
<i>Pseudocerastes urarachnoides</i>	2550- 2551- 2556
<i>Echis carinatus</i>	1450- 1779- 1813- 1814- 1975
<i>Montivipera albicornata</i>	2134- 2140- 2142- 2157- 2161-2112
<i>Spalerosophis diadema</i>	1535- 2063
مارهای نیمه سمی	ERP
<i>Telescopus tessellata</i>	1439- 1784
<i>Platyceps rhodorachis</i>	1446- 1447- 1942- 1943
<i>Hemorrhoids ravergieri</i>	1841- 1939- 2002
<i>Natrix tessellata</i>	1842- 1852- 1961
<i>Typhlops vermicularis</i>	1957- 1958- 1959- 1849
<i>Erix miliaris</i>	925- 926- 1018
<i>Eryx sp</i>	1051- 806

جدول ۲- توالی‌های پرایمر و شرایط PCR برای تقویت ژن‌ها

ژن	پرایمر	ترادف	برنامه تکثیر
Cyt b	L14910	5'- GAC CTG TGA TMT GAA AAA CCA YCG TTG T- 3'	Step 1: 95°C → 4 min Step 2: 38 Cycle 95°C 40s 45°C 40s 72°C 85s Step 3: 72°C → 10 min
	H16064d	5'- CTT TGG TTT ACA AGA ACA ATG CTT TA- 3'	
Cyt b (nested)	Lglulk	5'- AAC CGC TGT TGT CTT CAA CTA- 3'	Step 1: 95°C → 4 min Step 2: 38 Cycle 95°C 30s 49°C 40s 72°C 50s Step 3: 72°C → 10 min
	Mtb	5'- TTG TGA TTA CTG TAG CAC CTC AAA ATG ATA TTT GTC- 3'	
16S	16 SH	5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG- 3'	Step 1: 95°C → 1 min Step 2: 36 Cycle 95°C → 30s 49°C → 50s 72°C → 70s
	16 SL1	5'- CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT- 3'	

## نتایج

آزمون برابری گروه: انجام این آزمون بر داده‌های دمای ذوب ژن‌های مورد مطالعه نتایج ارائه شده در جدول ۴ را به دست داده است. مقدار معنی‌داری برای ژن Cytb کمتر از ۰/۰۵ است لذا می‌تواند برای شناسایی نمونه‌های مجهول مورد استفاده قرار گیرد.

تجزیه و تحلیل گونه‌ها با استفاده از هریک از ژن‌ها به تنهایی: با بررسی منحنی دمای ذوب گونه‌ها و ژل الکتروفورز با توجه به این ژن می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ژن Cytb به علت تغییرپذیری ترادف آن در بین گونه‌های *Pseudocerastes*، *Gloydus halys*، *Platycephalus spalerosophis diadema persicus*، *Eryx miliaris* و *Typhlops vermicularis rhodorachis* تمایز بهتری را نسبت به بقیه گونه‌ها نشان می‌دهد. در واقع استفاده از این ژن بین مارهای سمی و نیمه سمی تمایز بهتری را نشان داده است و این تمایز نشان از تفاوت بیشتر در توالی GC گونه‌ها می‌باشد. بنابراین چون برای Cyt b، مقدار معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ است احتمالاً می‌توان از داده‌های آن برای شناسایی گونه‌ها و احتمالاً شناسایی نمونه‌های مجهول استفاده کرد. طول قطعه تقویت شده Cyt b پرایمر ۴۴۷ جفت باز است. جدول ۵ زیر توالی‌های تقویت شده در گونه *Naja naja* را نشان می‌دهد. بررسی منحنی دمای ذوب گونه‌ها و ژل الکتروفورز با ژن 16 S نشان می‌دهد که این ژن به دلیل حفاظت شدگی بالا تمایز زیادی بین گونه‌ها را نشان نمی‌دهد و تنها توانایی جدا کردن گونه‌های اندکی از جمله *Hemorrhoids* و *Naja oxiana*، *Gloydus halys* را دارد. طول قطعه تکثیر شده توسط این جفت پرایمر ۵۵۶ جفت باز است.

منحنی‌های ذوب محصولات PCR ژن‌های Cyt b و 16S: منحنی ذوب با ثبت تغییرات شدت فلورسانس به ازای افزایش دما به دست می‌آید و نشان دهنده ناگهانی بودن دناتوره شدن قطعه DNA مورد مطالعه است، در صورتی قابل قبول که تک پیک باشد. ژن Cytb به روش PCR لانه‌گزين (nested PCR) تکثیر شد. اولین PCR با یک جفت پرایمر L14910- H16064d انجام گرفت و سپس برای اختصاصی کردن تکثیر منطقه هدف از جفت پرایمرهای دوم Lgluk - Mtb استفاده شد و نتایج دمای ذوب و ژل الکتروفورز رضایت‌بخش بود. منحنی‌های دمای ذوب محصولات PCR ژن Cyt b و 16S و تصاویر ژل الکتروفورز تعدادی از نمونه‌های مورد استفاده به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ آورده شده است. شرح کامل داده‌های به دست آمده از هر دو ژن در هر تاکسون در جدول ۳ آمده است.

داده‌های آماری: نتایج به دست آمده از آنالیز دمای ذوب ژن‌ها با استفاده از روش تحلیل ممیزی (DA: Discriminant Analysis) و نرم‌افزار SPSS در جدول ۳ آورده شده است. همچنین میانگین دمای ذوب ژن‌ها در گونه‌های مورد مطالعه به صورت نمودار ستونی در شکل ۳ قابل مشاهده است. مقادیر  $T_m$  محصولات Cytb بین ۸۲/۵ تا ۸۸/۵ و مقادیر  $T_m$  محصولات 16 S بین ۸۳/۷ و ۸۸ می‌باشد. دمای ذوب محصولات PCR ژن‌های Cytb و 16S و انحراف معیار آنها در گونه‌های مختلف در شکل ۳ نشان داده شده است. تنوع بیشتر و دامنه وسیع‌تر دمای ذوب در Cyt b می‌تواند تا حدودی نمایانگر تغییرپذیری بیشتر این ژن در مقایسه با ژن 16S در میان تاکسون‌های مورد مطالعه باشد.



پژوهشگر در این مطالعه از آن بی‌خبر بوده و تنها به نمونه DNA آن دسترسی دارد. تعداد ۴ نمونه مجهول برای ارزیابی قابلیت کاربرد دمای ذوب این دو ژن برای شناسایی تاکسونومیکی در اختیار پژوهشگر آزمایشگاهی قرار گرفت. مراحل تکثیر ژن‌ها و تعیین دمای ذوب با روشی یکسان با نمونه‌های معلوم انجام شد. بر اساس نقطه‌یابی طبق معادله‌هایی که در بالا به آن‌ها اشاره شد از بین این ۴ نمونه، ۲ تا به درستی تشخیص داده شد که نمونه شماره ۱ متعلق به گونه‌ی *Macrovipera lebetina* و نمونه شماره ۲ متعلق به گونه‌ی *Platyceps rhodorachis* می‌باشد.

نمونه مجهول شماره ۳ با توجه به داده‌های نمونه‌های معلوم قابل شناسایی نبود. نمونه شماره ۴ به درستی تشخیص داده نشد. در روش دوم آنالیز داده‌ها دمای ذوب ژن‌های 16S و Cyt b به ترتیب بر روی محورهای x و y نشان داده شد و نقشه مختصات دمای ذوب ژن‌های مزبور برای گونه‌های مورد مطالعه تهیه شد (شکل ۵).

مقادیر دمای ذوب نمونه‌های مجهول نقطه مربوطه را بر روی این نقشه مختصات مشخص و در نتیجه جمعیت گونه‌ای که به آن متعلق است را معرفی می‌کند. در این روش نیز نمونه مجهول با بالاترین احتمال به گونه‌ای متعلق است که در نزدیکترین فاصله با موقعیت مکانی محاسبه شده برای آن در روی نقشه مختصات قرار دارد.

بر این اساس، نمونه‌های مجهول شماره ۱ و ۲ با نتایج حاصل از معادله‌ی تعیین نقطه مکانی (روش تحلیل ممیزی) یکسان بودند، نمونه شماره ۳ متعلق به *Echis carinatus* و نمونه شماره ۴ متعلق به *Hemorrois ravergieri* بود. تعداد ۴ نمونه مجهول برای ارزیابی قابلیت کاربرد دمای ذوب این دو ژن برای شناسایی تاکسونومیکی در اختیار پژوهشگر آزمایشگاهی قرار

شناسایی نمونه‌های مجهول با استفاده از دمای ذوب هر دو ژن: همانطور که داده‌های شکل ۳ نشان می‌دهد مقادیر دمای ذوب هریک از ژن‌ها به تنهایی توانایی تفکیک چندان مناسبی نخواهد داشت. اگرچه پراکندگی داده‌های مربوط به Cyt b مقداری بهتر از 16S است. اما احتمالاً می‌توان از هر دو کمیت دمای ذوب بطور همزمان استفاده کرد. برای این منظور از دو روش بهره گرفتیم: تحلیل ممیزی که یک روش شناخته شده آماری است و نقشه مختصات دمای ذوب ژن‌های مورد مطالعه.

در روش تحلیل ممیزی در ابتدا باید معادلات ریاضی را به دست آورد که شامل هر دو کمیت بوده و پراکندگی نقاط مختصات گونه‌ها را تعریف کند. با بررسی داده‌های دمای ذوب این دو ژن در روش تحلیل ممیزی روابط زیر حاصل شد:

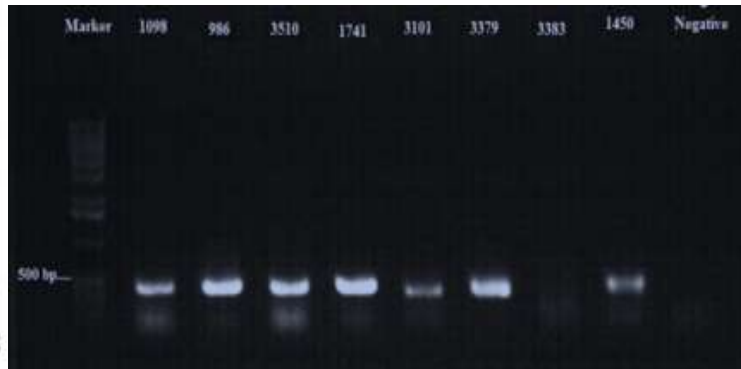
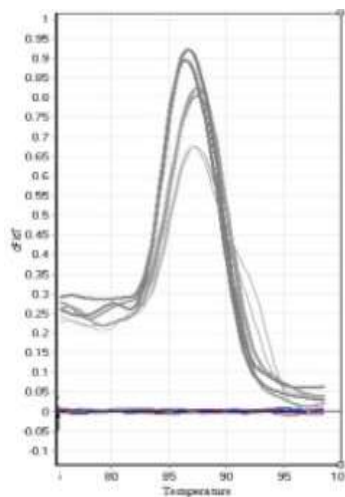
$$Dis1 = -0.36 * T_m Cytb + 0.893 * T_m 16S$$

$$Dis2 = 0.94 * T_m Cytb + 0.464 * T_m 16S$$

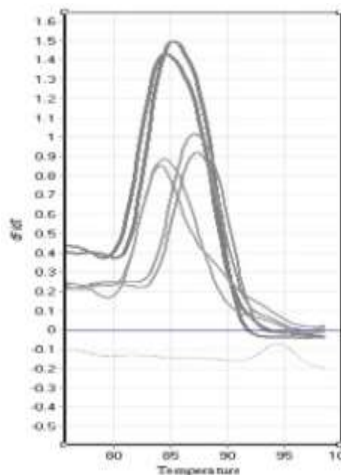
برای نمونه‌های مربوط به هر گونه باید مقدار معادله‌های فوق را با استفاده از میانگین داده‌های دمای ذوب ژن‌های مورد مطالعه محاسبه و مکان نقطه‌ی مربوط به گونه را با دو عدد (Dis1, Dis2) روی نمودار (شکل ۴) مشخص نمود. با انجام عملیات مشابه بر روی مقادیر دمای ذوب ژن‌های مزبور در نمونه‌های مجهول و کمیت‌های بدست آمده برای Dis1, Dis2 و مشخص شدن نقطه متعلق به آن در نمودار مشخص می‌شود که نمونه مجهول به کدام گونه تعلق دارد. نمونه مجهول به گونه‌ای تعلق دارد که فاصله نقطه‌ی محاسبه شده برای آن به مرکز آن گروه نزدیکتر باشد. در این صورت گونه‌های معلومی که کمترین فاصله را از گونه‌ی مجهول داشته باشد (و همچنین از طریق نرم‌افزار SPSS) گونه متعلقه را معرفی می‌کند. نمونه‌های مجهول مورد استفاده در این بررسی قبلاً از طریق ویژگی‌های مورفولوژی در آزمایشگاه جانورشناسی شناسایی شده‌اند. اگرچه

تهیه شد (شکل ۵). مقادیر دمای ذوب نمونه‌های مجهول نقطه مربوطه را بر روی این نقشه مختصات مشخص و در نتیجه جمعیت گونه‌ای که به آن متعلق است را معرفی می‌کند. در این روش نیز نمونه مجهول با بالاترین احتمال به گونه‌ای متعلق است که در نزدیکترین فاصله با موقعیت مکانی محاسبه شده برای آن در روی نقشه مختصات قرار دارد. بر این اساس، نمونه‌های مجهول شماره ۱ و ۲ با نتایج حاصل از معادلی تعیین نقطه مکانی (روش تحلیل ممیزی) یکسان بودند، نمونه شماره ۳ متعلق به *Echis carinatus* و نمونه شماره ۴ متعلق به *Hemorrhoids ravergieri* بود.

گرفت. مراحل تکثیر ژن‌ها و تعیین دمای ذوب با روشی یکسان با نمونه‌های معلوم انجام شد. بر اساس نقطه‌یابی طبق معادله‌هایی که در بالا به آنها اشاره شد از بین این ۴ نمونه، ۲ تا به درستی تشخیص داده شد که نمونه شماره ۱ متعلق به گونه‌ی *Macrovipera lebetina* و نمونه شماره ۲ متعلق به گونه‌ی *Platyceps rhodorachis* می‌باشد. نمونه مجهول شماره ۳ با توجه به داده‌های نمونه‌های معلوم قابل شناسایی نبود. نمونه شماره ۴ به درستی تشخیص داده نشد. در روش دوم آنالیز داده‌ها دمای ذوب ژن‌های 16S و Cyt b به ترتیب بر روی محورهای x و y نشان داده شد و نقشه مختصات دمای ذوب ژن‌های مزبور برای گونه‌های مورد مطالعه

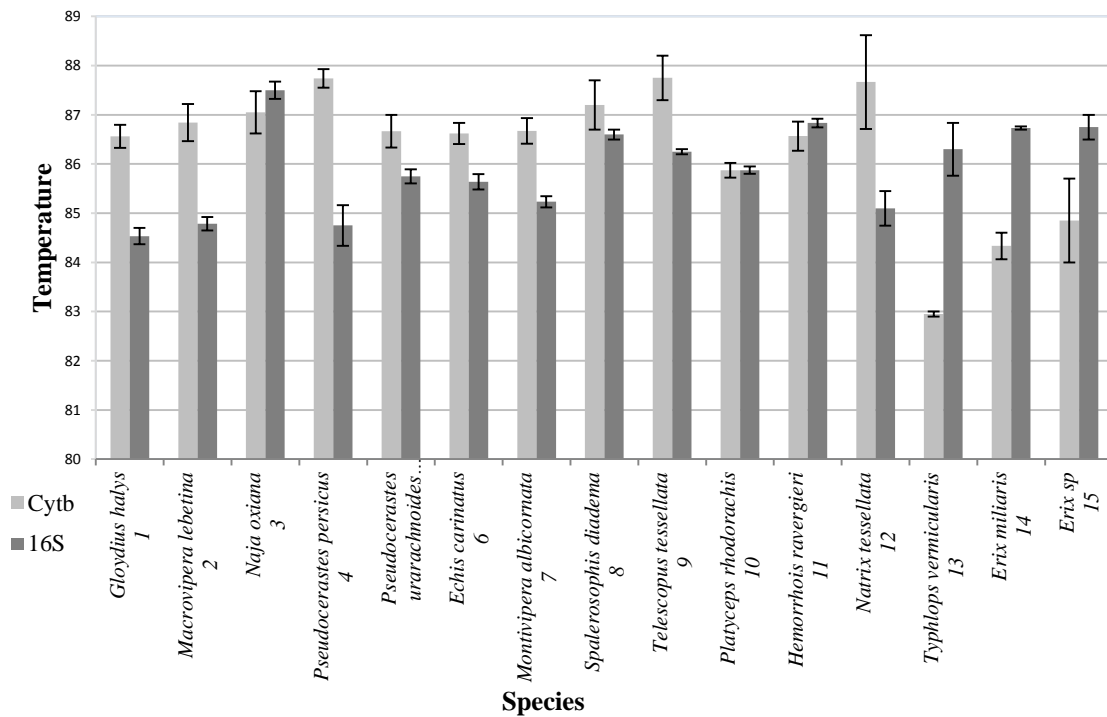


شکل ۱- نمودار دمای ذوب (چپ) و ژل الکتروفورز (راست) محصولات (Cytb (Nested PCR). در نمودار دمای ذوب منحنی‌های مربوط به نمونه‌هایی از هر تاکسون با ضخامت و درجه تیرگی رنگ یکسان نشان داده شده است.

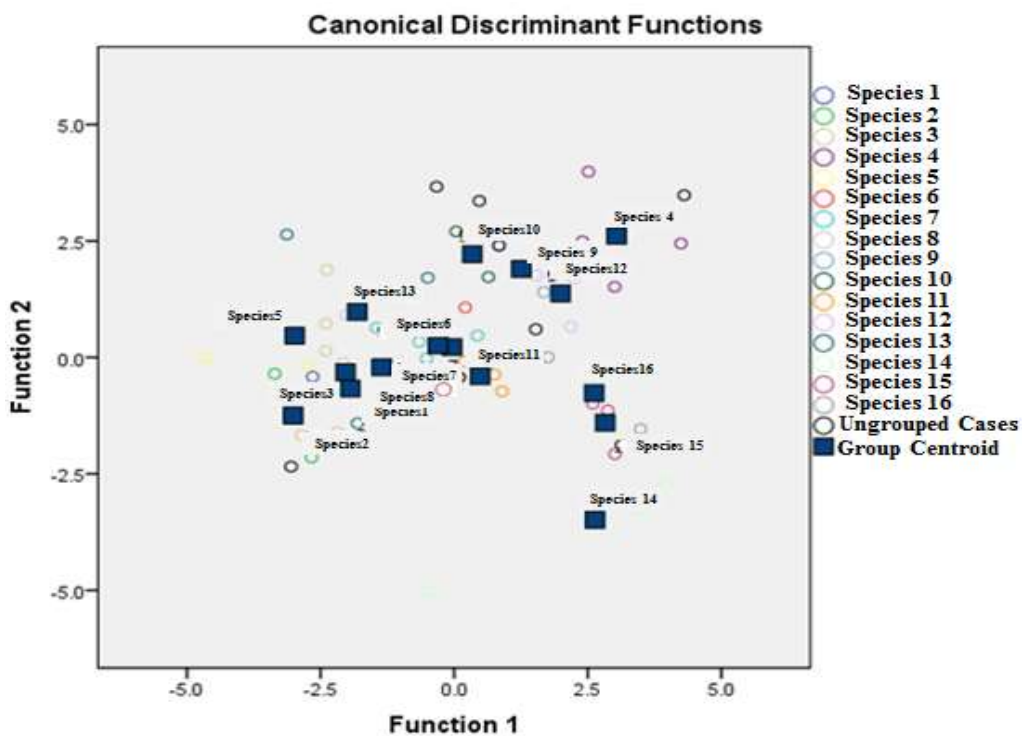




شکل ۲- نمودار دمای ذوب (چپ) و ژل الکتروفورز (راست) محصولات 16 S. در نمودار دمای ذوب منحنی‌های مربوط به نمونه‌هایی از هر تاکسون با ضخامت و درجه تیرگی رنگ یکسان نشان داده شده است.

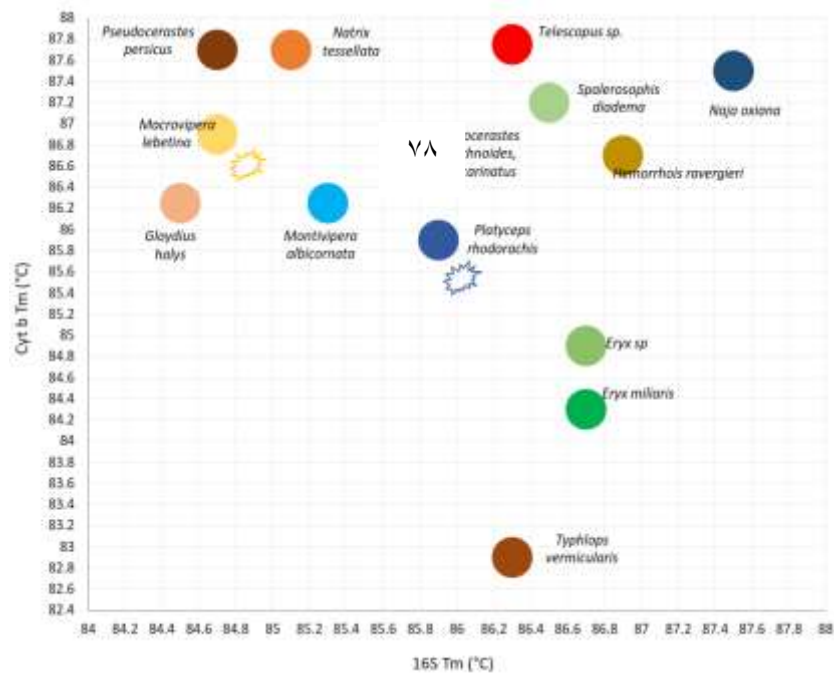


شکل ۳- نمودار ستونی مقایسه‌ی گونه‌ها بر اساس ژن‌های 16 S و Cytb.



شکل ۴- نمودار تعیین نقطه مکانی و تشخیص نمونه مجهول





شکل ۵- نقشه مختصات دمای ذوب ژن‌های 16 S و Cyt b در تاکسون‌های مارهای سمی و نیمه سمی ایران

جدول ۳- داده‌های آماری حاصل از دنا توراسیون گرمایی محصولات PCR ژن Cytb و 16 S

نام ژن	16 S	Cytb	16 S	Cytb	16 S	Cytb	
نام گونه	<i>Gloydius halys</i>		<i>Macrovipera lebetina</i>		<i>Naja oxiana</i>		
میانگین	۸۴/۵۳۳۳	۸۶/۵۶۰۰	میانگین	۸۴/۷۸۵۷	۸۶/۸۴۲۹	میانگین	۸۷/۰۵۰۰
تعداد	۶	۶	تعداد	۷	۷	تعداد	۴
انحراف معیار	۰/۴۰۳۳۲	۰/۵۷۴۸۰	انحراف معیار	۰/۳۶۲۵۳	۰/۹۹۴۷۵	انحراف معیار	۰/۳۵۵۹
خطای معیار	۰/۱۶۴۶۵	۰/۲۳۴۶۶	خطای معیار	۰/۱۳۷۰۲	۰/۳۷۵۹۸	خطای معیار	۰/۱۷۷۹۵
حداقل	۸۴/۲	۸۵/۸۰	حداقل	۸۴/۲	۸۶/۰۰	حداقل	۸۷/۲
حداکثر	۸۵/۳	۸۷/۳۰	حداکثر	۸۵/۳	۸۸/۵۰	حداکثر	۸۸
پایین‌ترین باند	۸۴/۱۱۰۱	۸۵/۹۵۶۸	پایین‌ترین باند	۸۴/۴۵۰۴	۸۵/۹۲۲۹	پایین‌ترین باند	۸۶/۹۳۳۷
بالا‌ترین باند	۸۴/۹۵۶۶	۸۷/۱۶۳۲	بالا‌ترین باند	۸۵/۱۲۱	۸۷/۷۶۲۸	بالا‌ترین باند	۸۸/۰۶۶۳
	<i>Pseudocerastes persicus</i>		<i>Pseudocerastes urarachnoides</i>		<i>Echis carinatus</i>		
میانگین	۸۴/۷۵	۸۷/۱۳۲۵	میانگین	۸۵/۷۵	۸۶/۶۶۶۷	میانگین	۸۵/۶۴
تعداد	۴	۴	تعداد	۳	۳	تعداد	۵
انحراف معیار	۰/۸۲۲۶	۰/۳۷۷۱۳	انحراف معیار	۰/۲۵۰۰۶	۰/۵۷۷۳۵	انحراف معیار	۰/۳۵۰۷۱
خطای معیار	۰/۴۱۱۳	۰/۱۸۸۵۶	خطای معیار	۰/۱۴۴۵۴۷	۰/۳۳۳۳۳	خطای معیار	۰/۱۵۶۸۴
حداقل	۸۳/۷	۸۷/۲۰	حداقل	۸۵/۵	۸۶/۰۰	حداقل	۸۵/۲
حداکثر	۸۵/۵	۸۸/۰۰	حداکثر	۸۶	۸۷/۰۰	حداکثر	۸۶
پایین‌ترین باند	۸۳/۴۴۱۱	۸۷/۱۳۲۴	پایین‌ترین باند	۸۵/۲۷۶۰	۸۵/۲۳۲۴	پایین‌ترین باند	۸۵/۲۰۴۵
بالا‌ترین باند	۸۶/۰۵۸۹	۸۸/۳۳۲۶	بالا‌ترین باند	۸۶/۰۳۱۲	۸۸/۱۰۰۹	بالا‌ترین باند	۸۶/۰۷۵۵
	<i>Montivipera albicornata</i>		<i>Spalerosophis diadema</i>		<i>Telescopus spp.</i>		
میانگین	۸۵/۱۳۳۳	۸۶/۱۷۳۳	میانگین	۸۶/۶	۸۷/۲۰۰۰	میانگین	۸۶/۲۵
تعداد	۶	۶	تعداد	۲	۲	تعداد	۲



انحراف معیار	۰/۲۸۰۴۸	۰/۶۴۳۰۴	انحراف معیار	۰/۱۴۱۴۲	۰/۷۰۷۱۱	انحراف معیار	۰/۰۷۰۷۱	۰/۶۳۶۴۰
خطای معیار	۰/۱۱۴۵	۰/۲۶۲۵۲	خطای معیار	۰/۱	۰/۵۰۰۰۰	خطای معیار	۰/۰۵	۰/۴۵۰۰۰
حداقل	۸۴/۸	۸۶/۰۰	حداقل	۸۶/۵	۸۶/۷۰	حداقل	۸۶/۲	۸۷/۳۰
حداکثر	۸۵/۵	۸۷/۷۰	حداکثر	۸۶/۷	۸۷/۷۰	حداکثر	۸۶/۳	۸۸/۲۰
پایین ترین باند	۸۴/۹۳۹	۸۵/۹۹۸۵	پایین ترین باند	۸۵/۳۲۹۴	۸۰/۸۴۶۹	پایین ترین باند	۸۵/۶۱۴۷	۸۲/۰۳۲۲
بالا ترین باند	۸۵/۵۲۷۷	۸۷/۳۴۸۲	بالا ترین باند	۸۷/۸۷۰۶	۹۳/۵۵۳۱	بالا ترین باند	۸۶/۸۸۵۳	۹۳/۶۴۷۸
<i>Platyceps rhodorachis</i>		<i>Hemorrhais ravergieri</i>			<i>Natrix tessellate</i>			
میانگین	۸۵/۸۷۵	۸۵/۸۷۵۰	میانگین	۸۶/۸۳۳۳	۸۷/۵۶۶۷	میانگین	۸۵/۱	۸۷/۶۶۶۷
تعداد	۴	۴	تعداد	۳	۳	تعداد	۳	۳
انحراف معیار	۰/۱۵	۰/۲۹۸۶۱	انحراف معیار	۰/۱۵۲۷۵	۰/۵۱۳۱۶	انحراف معیار	۰/۶۰۸۲۸	۱/۶۵۰۲۵
خطای معیار	۰/۰۷۵	۰/۱۴۹۳۰	خطای معیار	۰/۰۸۱۱۹	۰/۲۹۶۲۷	خطای معیار	۰/۳۵۱۱۹	۰/۹۵۲۷۷
حداقل	۸۵/۷	۸۵/۵۰	حداقل	۸۶/۷	۸۶/۰۰	حداقل	۸۴/۷	۸۶/۰۰
حداکثر	۸۶	۸۶/۲۰	حداکثر	۸۷	۸۷/۰۰	حداکثر	۸۵/۸	۸۹/۳۰
پایین ترین باند	۸۵/۶۳۶۳	۰/۳۹۹۸	پایین ترین باند	۸۶/۴۵۳۹	۸۵/۳۹۱۹	پایین ترین باند	۸۳/۵۸۹	۸۳/۵۷۶۲
بالا ترین باند	۸۶/۱۱۳۷	۸۶/۳۵۰۲	بالا ترین باند	۸۷/۲۱۲۸	۸۷/۸۴۱۴	بالا ترین باند	۸۶/۶۱۱	۹۱/۷۶۶۱
<i>Typhlops vermicularis</i>		<i>Erix miliaris</i>			<i>Eryx sp</i>			
میانگین	۸۶/۳	۸۲/۹۵۰۰	میانگین	۸۶/۱۳۳۳	۸۴/۳۳۳۳	میانگین	۸۶/۷۵	۸۴/۸۵۰۰
تعداد	۴	۴	تعداد	۳	۳	تعداد	۲	۲
انحراف معیار	۱/۰۷۳۹۳	۰/۱۰۰۰۰	انحراف معیار	۰/۰۵۷۷۴	۰/۴۷۲۵۸	انحراف معیار	۰/۳۵۳۵۵	۱/۲۰۲۰۸
خطای معیار	۰/۵۳۶۹۷	۰/۵۰۰۰۰	خطای معیار	۰/۰۳۳۳۳	۰/۲۷۲۸۵	خطای معیار	۰/۲۵	۰/۸۵۰۰۰
حداقل	۸۴/۷	۸۲/۸۰	حداقل	۸۶/۷	۸۳/۸۰	حداقل	۸۶/۵	۸۴/۰۰
حداکثر	۸۷	۸۳/۰۰	حداکثر	۸۶/۸	۸۴/۷۰	حداکثر	۸۷	۸۵/۷۰
پایین ترین باند	۸۴/۵۹۱۱	۸۲/۷۹۰۹	پایین ترین باند	۸۶/۵۸۹۹	۸۳/۱۵۹۴	پایین ترین باند	۸۳/۵۷۳۴	۷۴/۰۴۹۷
بالا ترین باند	۸۷/۰۰۸۹	۸۳/۱۰۹۱	بالا ترین باند	۸۶/۸۷۶۸	۸۵/۵۰۷۳	بالا ترین باند	۸۹/۹۲۶۶	۹۵/۶۵۰۳
<b>Total</b>		<b>95% Confidence Interval for Mean</b>						
ژن	میانگین	تعداد	انحراف معیار	خطای معیار	حداقل	حداکثر	پایین ترین باند	بالا ترین باند
16 S	۵۸	۸۵/۱۳۲۸	۴/۴۰۵۲۸	۰/۵۷۸۴۴	۵۳	۸۸	۸۳/۹۷۴۵	۸۶/۲۹۱۱
Cytb	۵۸	۸۶/۳۸۱۶	۱/۳۹۱۰۱	۰/۱۸۲۶۵	۸۲/۸۰	۸۹/۳۰	۸۶/۰۱۵۸	۸۶/۷۴۷۳

جدول ۴- آزمون برابری گروه‌ها

		مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع میانگین	F	Sig.
<b>16 S</b>	بین گروهی	۳۸۱/۶۳۳	۱۴	۲۷/۲۶۰	۱/۶۱۸	۰/۱۱۳
	درون گروهی	۷۲۴/۵۳۵	۴۳	۱۶/۸۵۰		
	کل	۱۱۰۶/۱۶۸	۵۷			
<b>Cytb</b>	بین گروهی	۸۷/۳۵۵	۱۴	۶/۲۴۰	۱۱/۶۹۸	۰/۰۰۰
	درون گروهی	۲۲/۹۳۶	۴۳	۰/۵۳۳		
	کل	۱۱۰/۲۹۱	۵۷			

جدول ۵- موقعیت اتصال جفت پرایمر (Lglulk (Forward) + Mtb (Reverse) به ژن Cyt b و جفت پرایمر + 16 SL

16 SH به ژن میتوکندریایی 16 S در گونه *Naja naja*

**Cyt b:**  
 5'AACCACCGTTGTTTCATCAACTACAAAAACATGTCCAACCAACATGTCCTTCTAACATCCAATC  
 TTCTTCTGTTGGATCCAACATCTCTACCTGATGAAATTTTGGCTCTATACTACTAGCTTCCTAA  
 TACTACAAATTATAACCGGATTCTTCTAGCAATCTACTACACAGCCAACATTAACCTAGCCTT  
 CTCATCAGTGATTACATCACGCGGGACGTACCTTACGGGTGAATCATACAAAAACCTTCACACA  
 ATCAGCGCTCCCTATTCTTCATCTGTATCTACACCCATATCGCACGAGGACTCTACTATGGTTT  
 ATACCTAAATAAAGAAGTTTGACTATCAGGAACAGCCCTCCTGGTTATCCTTATAGCAACAGCC  
 TTCTTCGGATACGTCCTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGCAGCAACAGTAATCACC -3'

**16 S:**  
 5'**CGACTGTTTAAACAAAAACATA**ACCTTTAGTCAATAAACCAATATTAAGGCAACGCCTGCCA  
 GTGAACAATTTAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCACAACTACTTGCTATTAA  
 TTGTAGACCTGTATGAAAGGCAAAACGAGGGCCTATCTGTCTCTTGTAGTAAATCAATTAACCT  
 GATCTCCAGTCCAAAAGCTGGGATGCCAACATAAGACCAGAAGACCCTGTGAAGCTTAAACT  
 AAATAATTAATCCTATAATAGCTCCTTTTCGGTTGGGCGACCCCTGGAAAAAAAAAGAAGCTTCC  
 AAACATACTGACCTTACAGTCACCTACCCTAGGCCAACAAAGCCTAACAAACGACCCAGCACAGCt  
 GATAATTGAACCAAGTTACTCCAGGGATAACAGCGCTATCTTCTTCAAGAGCCCATATCAAAAA  
 GAAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCG  
 TTTGTTCAACGATTAACAGTCCCACGTGATCTGAGTTCAGACCCGG-3'

## بحث

موجود، محدودیت زمان و از آن مهم‌تر سؤال پژوهش دارد. انواع روش‌های مورد استفاده برای شناسایی گونه‌ها اگرچه مزایای خاص خود را دارند، دارای معایبی از جمله پرهزینه و زمانبر بودن نیز می‌باشند. با وجود اقبال عمومی برای استفاده از داده‌های مولکولی به ویژه توالی DNA در مطالعات رده‌بندی و پیشرفت‌های چشمگیر سده اخیر در فن‌آوری‌های توالی‌یابی DNA و دستیابی به نسل جدید توالی‌یابی (next generation sequencing - NGS) هنوز محدودیت دسترسی ارزان قیمت به امکانات توالی‌یابی از مهمترین موانع می‌باشد (۱۳).

مطالعه‌ی حاضر اولین مطالعه‌ی شناسایی گونه‌ها است که قابلیت به کارگیری دمای ذوب یک تفاوت مهم بیوشیمی - بیوفیزیکی توالی‌های اختصاصی است، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. برای این مطالعه تاکسون‌های مارهای سمی و نیمه سمی ایران مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات قبلی شناسایی گونه بیشتر مبتنی بر ویژگی‌های مورفولوژیکی، نشانگرهای

مفهوم "گونه" شاید بیشترین موضوع مورد بحث در زیست‌شناسی تکاملی است که بیش از بیست تعریف مختلف برای آن بر پایه انواع روش‌ها و معیارهای مختلف دارد. در نسبت دادن یک ارگانیسم به یک گروه بیولوژیک معنی‌دار ابتدا باید از تاریخ تکامل و وضعیت طبقه‌بندی نمونه مورد مطالعه آگاه بود. به عبارت دیگر باید درک درستی از انشعاب و سنین واگرایی (فیلولوژی) موجودات مورد مطالعه داشته و از نام‌گذاری مورد استفاده در مطالعات قبلی شناخت داشت. برای ارائه یک روش جدید و یا نشانگر ژنتیکی برای اولین بار، باید ترکیب ژنتیکی مورد مطالعه از همه گونه‌های تاکسون مربوطه باشند و در صورت امکان بیش از یک نمونه به‌عنوان نماینده‌ای از افراد، ترجیحاً از مکان‌های جغرافیایی مختلف مطالعه شود. لازم به یادآوری است که هیچ روش کامل و جامع رده‌بندی بر اساس DNA وجود ندارد و اغلب وابسته به تعدادی عوامل از جمله: تجهیزات آزمایشگاهی، محدودیت‌های مالی، تخصص‌های



مورد جالب توجه در این بررسی آن است که آخرین تاکسون مورد مطالعه در زمان انجام این پژوهش بر اساس نمونه برداری‌های میدانی تنها در حد جنس مورد شناسایی قرار گرفته بود و بنابراین نمونه‌های مربوطه با نام *Eryx sp.* نامگذاری شد. همانطور که در جدول ۳ دیده می‌شود میانگین دمای ذوب ژن 16 S در نمونه‌های این گروه با میانگین بدست آمده برای تاکسون *Eryx miliaris* یکسان است و دمای ذوب مربوط به Cyt b نیز بسیار نزدیک به تاکسون مزبور می‌باشد و لذا گمان یکی بودن آنها می‌رفت. در مطالعات بعدی آزمایشگاه با استفاده از مورفومتری و داده‌های توالی ژنی نمونه‌های این تاکسون هم *Eryx miliaris* تشخیص داده شدند. به عبارت دیگر این مطالعه یک گروه (تاکسون) مجهول را در خود حائز بوده و پیشنهاد یکی بودن آن با دیگر تاکسون معلوم این مطالعه نیز در نهایت با داده‌های بعدی آزمایشگاه مورد تأیید قرار گرفت.

اگرچه این روش مزایایی همچون ارزان قیمت و سهل الوصول بودن را داراست ولی از موارد ضعف این روش احتمال همپوشانی موقعیت‌های مکانی تاکسون‌های متفاوت بر روی نقشه مختصات دمای ذوب است چنانکه در دو تاکسون *Echis carinatus* و *Pseudocerastes urarachnoides* دیده می‌شود. اگرچه این مورد به احتمال بسیار زیاد به واسطه آلودگی در PCR می‌باشد چرا که هر یک از ژن‌ها در همه گونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش بایستی با همان یک جفت پرایمر عمومی تکثیر می‌شدند و با وجود نهایت دقت و حوصله برای جلوگیری از آلودگی، باز هم امکان سرایت آلودگی‌های بافتی از هنگام نمونه برداری‌های میدانی تا زمان انجام PCR همچنان می‌تواند وجود داشته باشد. از این رو به نظر می‌رسد این روش با وجود نوآورانه بودن و دقت نسبتاً بالا، نیازمند بررسی‌های تکمیلی و اصلاحات بیشتر می‌باشد. در

مولکولی و تعیین توالی DNA بوده است. در این مطالعه دمای ذوب محصولات PCR دو ژن مطرح در بررسی‌های فیلوژنتیکی Cyt b و 16 S در ۶۴ نمونه DNA مار از ۱۵ گونه و از مناطق مختلف ایران مورد آزمایش قرار گرفت.

### نتیجه‌گیری

طبق داده‌های حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که از بین ۲ ژن Cytb و 16 S وقتی به داده‌های حاصل از تنها یک ژن رجوع شود، Cytb فقط توانایی تمایز بین برخی از گونه‌ها را دارد، اما ژن 16 S قابلیت کمتری دارد. شاید علت تغییرپذیری بیشتر ژن Cytb و حفاظت‌شدگی بالای ژن 16 S در بین گونه‌ها باشد که طی روند تکامل و اثر جهش و انتخاب طبیعی بر توالی DNA رخ می‌دهد. معمولاً نرخ جهش DNA میتوکندریایی بسیار سریع‌تر از DNA هسته‌ای است اما باید در نظر داشت که تمام ژنوم میتوکندریایی با نرخ ثابتی جهش نمی‌یابد. به هر حال وقتی از دمای ذوب هر دو ژن استفاده می‌شود، توانایی تمایز گونه‌ای بهتر شده و همانطور که در بخش نتایج اشاره شد با روش تحلیل ممیزی ۲ نمونه از بین ۴ نمونه مجهول به درستی تشخیص داده شد و بطور کلی به نظر می‌رسد نمونه‌های مجهول با دقت حدود ۵۰٪ به درستی تشخیص داده شده‌اند. در حالیکه با استفاده از نقشه مختصات دمای ذوب ۳ نمونه از ۴ نمونه مجهول با اطمینان بالایی و به درستی شناسایی شدند. در حالیکه یک نمونه اگرچه با اطمینان کمتری (به دلیل فاصله نسبتاً زیاد از موقعیت‌های شناخته شده روی نقشه) ولی به درستی تشخیص داده شد. می‌توان گفت که استفاده از نقشه مختصات دمای ذوب تقریباً در ۷۵ درصد موارد تشخیص گونه‌ای آسان و درست را امکان پذیر ساخته است.

*Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Bioenergetics*, 1143(3), 243-271.

2. Dhama K., Chakraborty S., Tiwari R., Verma A.K., Saminathan M., Malik Y.S., Nikousefat Z., Javdani M., Khan R.U., 2014. A concept paper on novel technologies boosting production and safeguarding health of humans and animals. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 4(7): 353-370.

3. Ghazali S.N., Ahmad A., Quraishia S.F., Panneerchelvam S., Rashid N.H.A. 2016. Molecular characterization of ornamental fish (Poeciliidae) using mitochondrial DNA 12S rRNA and 16 S rRNA genes. *Annals of Biological Research*, 7(5): 5-11.

4. Graur D., Li W.H., 2000. *Molecular Evolution*, 2<sup>nd</sup> ed. (pp. 1-6): Sinauer Associates. Massachusetts.

5. Holmes D.J., Jasienska G., 2017. *Evolutionary Medicine and Life History Theory The Arc of Life*. Springer. New York. pp. 11-15.

6. Hsieh H.M., Liao S.P., Huang L.H., Kuo Y.C., Lin A., Lee J., Tsai L.C., 2008. Species identification of fragmented turtle shells by cytochrome b gene. *Forensic Science Journal*, 7: 45-47.

7. Kapli P., Botoni D., Ilgaz C., Kumlutas Y., Avcı A., Rastegar-Pouyani N., Fathinia B., Lymberakis P., Ahmadzadeh F., Poulakakis N., 2013. Molecular phylogeny and historical biogeography of the Anatolian lizard *Apathya* (Squamata, Lacertidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 992e1001.

8. Kumar S., Rzhetsky A., 1996. Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. *Journal of Molecular Evolution*, 42(2), 183-193.

9. Ming L., Yi L., Guo F., Siriguleng S., Jirimutu J. 2016. Molecular phylogeny of the Bactrian camel based on mitochondrial Cytochrome b gene sequences. *Genetics and Molecular Research*, 15: 15038983.

این راستا پیشنهاد استفاده از یک ژن سوم نیز مطرح می‌باشد که در این صورت موقعیت مکانی هر تاکسون با استفاده از سه کمیت عددی و در نتیجه مختصات x، y، و z در سه بعد مشخص خواهد شد که منطقی می‌تواند احتمال همپوشانی کمتری برای آنها وجود دارد و انتظار می‌رود تشخیص‌ها از صحت بیشتری برخوردار باشند. بدیهی است در هر مطالعه‌ای دقت روش‌های آزمایشگاهی و نیز خطاهای دستگاهی و حساسیت آنها می‌تواند مورد تأمل باشد.

ما در این مطالعه با توجه به امکانات آزمایشگاهی در دسترس از دستگاه Real-Time PCR (CORBET) استفاده کردیم که حساسیتی به مراتب کمتر از دستگاه‌های پیشرفته جدید مجهز به HRM داراست. پیش بینی می‌شود که با استفاده از دستگاه HRM که دارای حساسیت خیلی بالایی بوده و دقت سنجش  $T_m$  را در حد صدم درجه سانتیگراد به دست خواهد داد، میزان حساسیت و دقت روش پیشنهادی این مطالعه می‌تواند بطور قابل ملاحظه‌ای بهبود یافته و با خطاهای کمتری همراه باشد. استفاده از چنین فن‌آوری که می‌تواند تغییر در حتی یک نوکلئوتید در مطالعات SNP را تشخیص دهد می‌تواند نتایج قابل اطمینان‌تری را فراهم آورد.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از زحمات آقای دکتر حمزه اورعی و خانم دکتر آذر خسروانی (مسئولین محترم آزمایشگاه جانورشناسی دانشگاه حکیم سبزواری) و آقای دکتر قدسی به سبب همکاری کمال تشکر را داریم.

#### منابع

1. Degli Esposti M., De Vries S., Crimi M., Ghelli A., Patarnello T., Meyer A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein.



16. Sacchi C.T., Whitney A.M., Mayer L.W., Morey R., Steigerwalt A., Boras A., Popovic T., 2002. Sequencing of 16 S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases*, 8(10): 1117-1123.
17. Singh A., 2012. Molecular taxonomy: use of modern methods in the identification of a species. *International Journal of Life Sciences*, 2(1): 143-147.
18. Tiwari A., Wadhwa V., 2005. MeltDNA: Tool for prediction of DNA duplex hybridization and melting thermodynamics. *Bioinformatics India*. 1: 35-43.
19. Tsai L.C., Huang M.T., Hsiao C.T., Lin A. C.Y., Chen S.J., Lee C., Hsieh H.M. 2007. Species identification of animal specimens by cytochrome b gene. *Forensic Science Journal*, 6(1): 63-65.
20. Větrovský T., Baldrian P. 2013. The variability of the 16 S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One*, 8(2): e57923.
21. Wittwer C.T., 2009. High resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human Mutation*, 30(6): 857-859.
10. Owczarzy R., Tataurov A.V., Wu Y., Manthey J.A., McQuisten K.A., Almabrazi H.G., Pedersen K.F., Lin Y., Garretson J., McEntaggart N.O., Sailor C.A., Dawson R.B., Peek A.S., 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl. 2): W163-W169.
11. Pei A.Y., Oberdorf W.E., Nossa C.W., Agarwal A., Chokshi P., Gerz E.A., Poles M., 2010. Diversity of 16 S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12): 3886-3897.
12. Pereira F., Carneiro J., Amorim A., 2008. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Patents on DNA and Gene Sequences*, 2(3): 187-200.
13. Raupach M.J., Radulovici A.E., 2015. Looking back on a decade of barcoding crustaceans. *Zookeys*, 539: 53-81
14. Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomic*, 8(6): 597-608
15. Rokas A., Ladoukakis E., Zouros E., 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(8): 411-417.