ارزیابی قابلیت کاربرد دمای ذوب محصولات PCR ژن‌های مورد استفاده در بررسی‌های فیلوژنتیکی به منظور شناسایی تاکسون‌های مارها

لیلا مرادی جافری، سکینه کاظمی نورعینی*، اسکندر رستگار پویانی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

*مسئول مکاتبات: Kazemibio@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲

چکیده

دئوکسی ریبونوکلئیک 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 فیلوژنتیکی 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 ارگانیسم‌های 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 زیست شناختی مولکولی در دسترس است. این مطالعه بر استفاده‌ی بالقوه از دمای ذوب (Tm) محصولات PCR ژن‌های 16S و Cyt b (ژن‌های پرکاربرد در مطالعات فیلوژنتیکی) 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، فیلوژنی مولکولی، مارها ژن سیتوکروم b، ژن 16S.

مقدمه

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 گونه ها 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 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

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 واگرا 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 DNAیی 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 انوع 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 ارگانیسم است چون دو ارگانیسم می‌توانند میزان یکسانی GC داشته و در عین حال از نظر تاکسونومیکی و فیلوژنیکی 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 ریبوزومی هسته‌ای (srRNA) از پرکاربردترین‌ها است که به‌دلیل 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 (٤). بنابراین سیتوکروم b یک ژن کد کننده‌ی 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 مطالعه‌ی 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، ١٦). به دلایلی از جمله حضور جهانی این ژن در انواع گونه های جانداران، اجازه‌ی تعیین و تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیک در

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 کویل) (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 می دهد. اطلاعات بیشتر در منحنی ذوب کامل شده با استفاده از T_m بدست می‌آید (۱٤). در صورت عدم وجود عوامل بی‌ثبات کننده مانند اوره و یا فرمآمید، 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.

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 (٦).

تکثیر ژن‌ها به روش PCR و ارزیابی دمای ذوب: پرایمرهای اختصاصی برای 16 S و سیتوکروم b توسط Bioneer, South Korea سنتز شدند. توالی های 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 SYBR Green I ×0.75 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 اندازه-گیری 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 ١٦ 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

و عرض y نشان داده می شود 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 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.

جدول ۱- اسامی گونه‌های سمی و نیمه‌سمی مارهای مورد استفاده

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

جدول ۲- توالی‌های پرایمر و شرایط PCR برای تقویت ژن‌ها

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

Step 3: 72°C → 10 min

نتایج

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 لانه گزین (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 Lglulk – 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 داده های 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 می تواند تا حدودی نمایانگر تغییرپذیری بیشتر این ژن در مقایسه با ژن 16S در میان تاکسون‌های مورد مطالعه **باشد.**

آزمون برابری گروه: انجام این آزمون بر داده‌های دمای ذوب ژن‌های مورد مطالعه نتایج ارائه شده در جدول ٤ 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 *Gloydius halys*، *Pseudocerastes persicus*، *Spalerosophis diadema*، *Platyceps rhodorachis*، *Typhlops vermicularis* و *Eryx miliaris* تمایز بهتری را نسبت به بقیه گونه ها 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 احتمالا شناسایی نمونه های مجهول استفاده کرد. طول قطعه تقویت شده Cyt b پرایمر ٤٤٧ جفت باز است. جدول ۵ زیر توالی‌های تقویت شده در گونه *Naja naja* را نشان می دهد. 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 *Gloydius halys*، *Naja oxiana* و *Hemorrhois ravergieri* را دارد. طول قطعه تکثیر شده توسط این جفت پرایمر ٥٥٦ جفت باز است.

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 16 S 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 داده های دمای ذوب این دو ژن در روش تحلیل ممیزی روابط زیر حاصل شد:

$$Dis1=-0.36*T_mCytb+0.893*T_m\ 16\ S$$
$$Dis2=0.94*T_mCytb+0.464*T_m\ 16\ S$$

برای نمونه های 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 ٤) 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 این‌صورت 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 پژوهشگر در این مطالعه از آن بی‌خبر بوده و تنها به نمونه DNA آن دسترسی دارد. تعداد ٤ 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 ٤ 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.

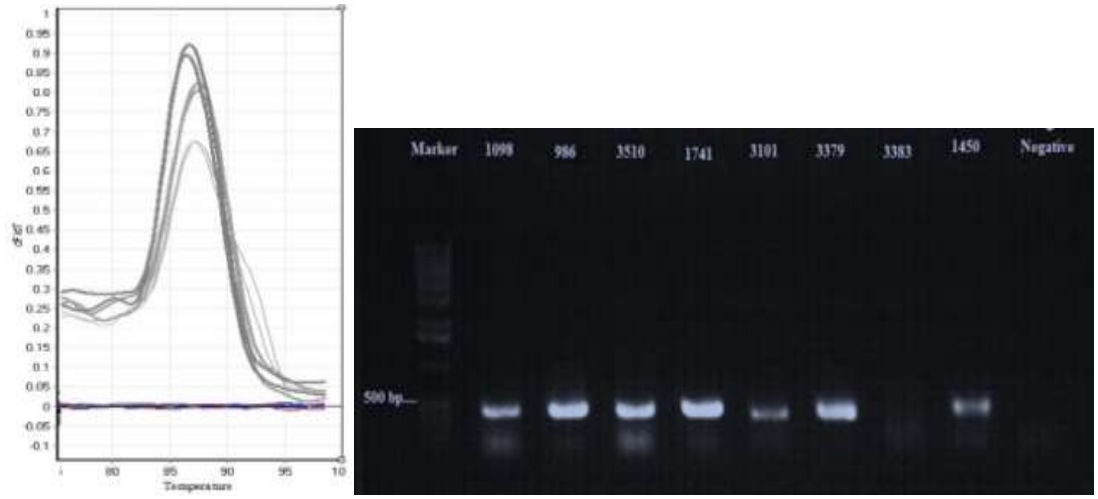
نمونه مجهول شماره ۳ با توجه به داده‌های نمونه‌های معلوم قابل شناسایی نبود. نمونه شماره ٤ به درستی تشخیص داده نشد. در روش دوم آنالیز داده ها دمای ذوب ژن‌های 16S و Cyt b به ترتیب بر روی محورهای x و y نشان داده شد و نقشه مختصات دمای ذوب ژن‌های مزبور برای گونه‌های مورد مطالعه تهیه شد (شکل ۵).

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.

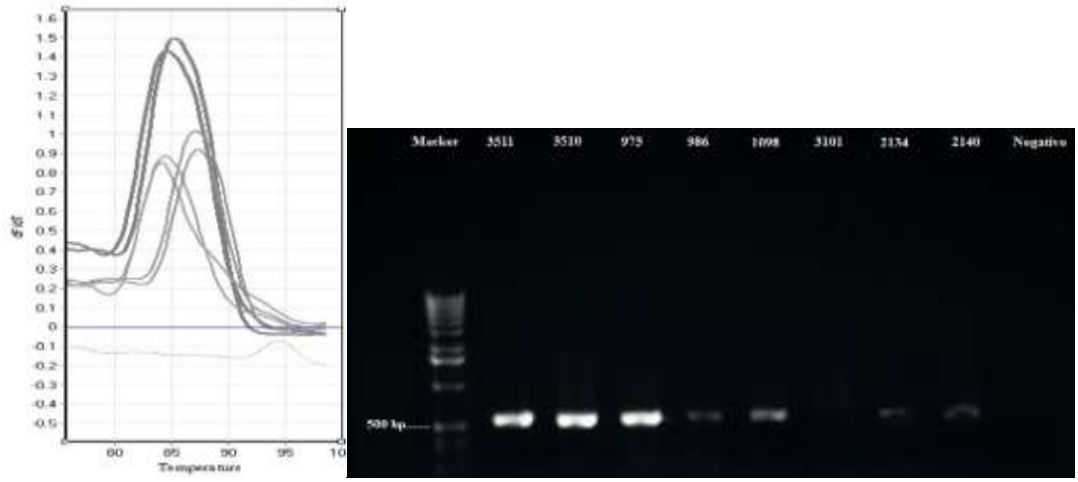
بر این اساس، نمونه‌های مجهول شماره ۱ و ۲ با نتایج حاصل از معادله‌ی تعیین نقطه مکانی (روش تحلیل ممیزی) یکسان بودند، نمونه شماره ۳ متعلق به *Echis carinatus* و نمونه شماره ٤ متعلق به *Hemorrois ravergieri* بود. تعداد ٤ نمونه مجهول برای ارزیابی قابلیت کاربرد دمای ذوب این دو ژن برای شناسایی تاکسونومیکی در اختیار پژوهشگر آزمایشگاهی قرار

گرفت. مراحل تکثیر ژن‌ها و تعیین دمای ذوب با روشی یکسان با نمونه های معلوم انجام شد.

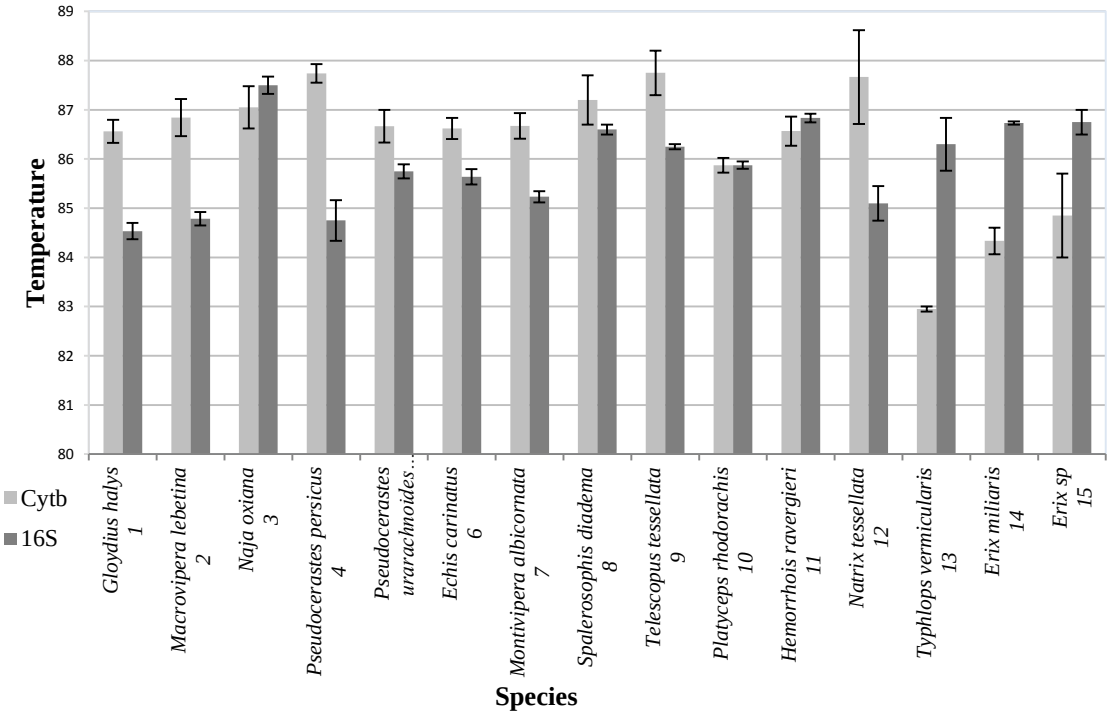
بر اساس نقطه‌یابی طبق معادله‌هایی که در بالا به آنها اشاره شد از بین این ٤ نمونه، ۲ تا به درستی تشخیص داده شد که نمونه شماره ۱ متعلق به گونه‌ی *Macrovipera lebetina* و نمونه شماره ۲ متعلق به گونه‌ی *Platyceps rhodorachis* می‌باشد. نمونه مجهول شماره ۳ با توجه به داده‌های نمونه‌های معلوم قابل شناسایی نبود. نمونه شماره ٤ 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 معادل‌ی تعیین نقطه مکانی (روش تحلیل ممیزی) یکسان بودند، نمونه شماره ۳ متعلق به *Echis carinatus* و نمونه شماره ٤ متعلق به *Hemorrois ravergieri* بود.



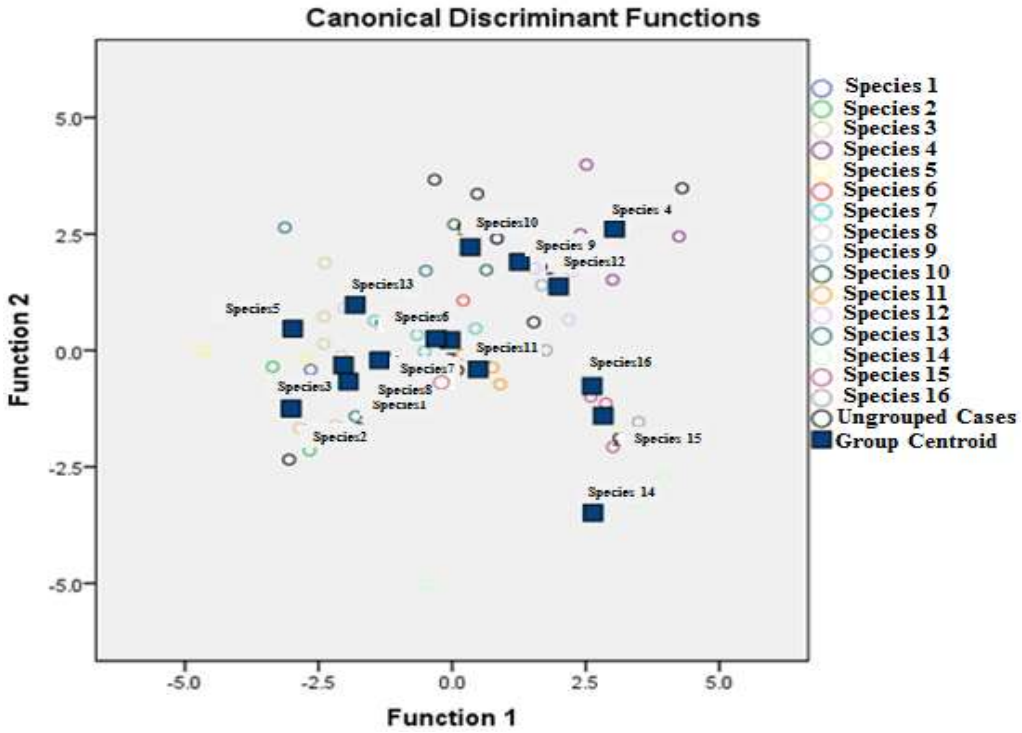
شکل۱- نمودار دمای ذوب (چپ) و ژل الکتروفورز (راست) محصولات Cytb (Nested PCR). در نمودار دمای ذوب منحنی-های مربوط به نمونه‌هایی از هر تاکسون با ضخامت و درجه تیرگی رنگ یکسان نشان داده شده است.



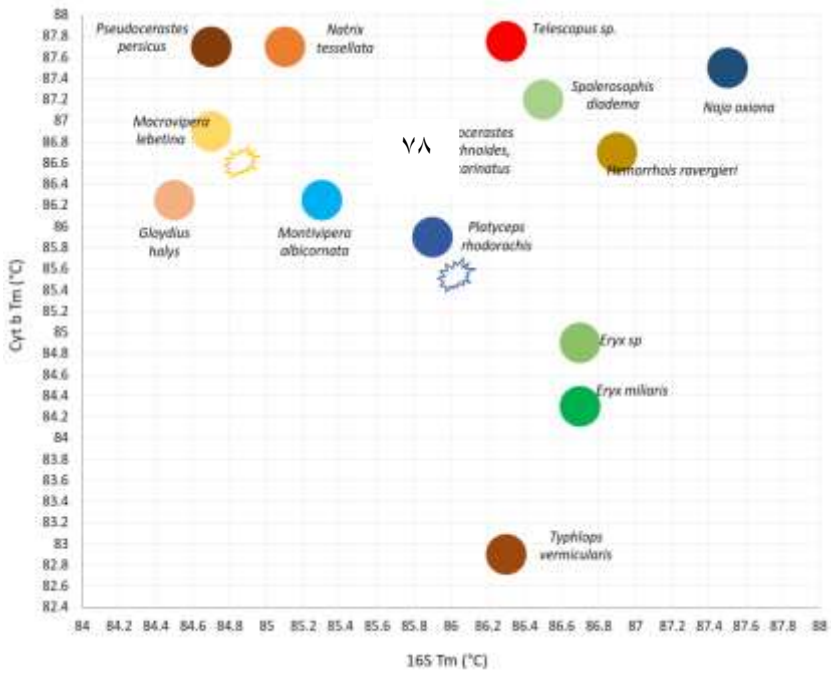
شکل ۲- نمودار دمای ذوب (چپ) و ژل الکتروفورز (راست) محصولات 16 S. در نمودار دمای ذوب منحنی‌های مربوط به نمونه‌هایی از هر تاکسون با ضخامت و درجه تیرگی رنگ یکسان نشان داده شده است.



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



شکل٤- 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 دناتوراسیون گرمایی محصولات PCR ژن Cytb و 16 S

نام ژن	16 S	Cytb		16 S	Cytb		16 S	Cytb
نام گونه	*Gloydius halys*			*Macrovipera lebetina*			*Naja oxiana*	
میانگین	۸٤/٥۳۳۳	۸٦/٥٦۰۰	میانگین	۸٤/۷۸٥۷	۸٦/۸٤۲۹	میانگین	۸۷/٥	۸۷/۰٥۰۰
تعداد	٦	٦	تعداد	۷	۷	تعداد	٤	٤
انحراف معیار	۰/٤۰۳۳۲	۰/٥۷٤۸۰	انحراف معیار	۰/۳٦۲٥۳	۰/۹۹٤۷٥	انحراف معیار	۰/۳٥٥۹	۰/۸٥۸۲۹
خطای معیار	۰/۱٦٤٦٥	۰/۲۳٤٦٦	خطای معیار	۰/۱۳۷۰۲	۰/۳۷٥۹۸	خطای معیار	۰/۱۷۷۹٥	۰/٤۲۹۱٥
حداقل	۸٤/۲	۸٥/۸۰	حداقل	۸٤/۲	۸٦/۰۰	حداقل	۸۷/۲	۸٦/۳۰
حداکثر	۸٥/۳	۸۷/۳۰	حداکثر	۸٥/۳	۸۸/٥۰	حداکثر	۸۸	۸۸/۲۰
پایین‌ترین باند	۸٤/۱۱۰۱	۸٥/۹٥٦۸	پایین‌ترین باند	۸٤/٤٥۰٤	۸٥/۹۲۲۹	پایین‌ترین باند	۸٦/۹۳۳۷	۸٥/٦۸٤۳
بالاترین باند	۸٤/۹٥٦٦	۸۷/۱٦۳۲	بالاترین باند	۸٥/۱۲۱	۸۷/۷٦۲۸	بالاترین باند	۸۸/۰٦٦۳	۸۸/٤۱٥۷
Pseudocerastes persicus			*Pseudocerastes urarachnoides*			*Echis carinatus*		
میانگین	۸٤/۷٥	۸۷/۷۳۲٥	میانگین	۸٥/۷٥	۸٦/٦٦٦۷	میانگین	۸٥/٦٤	۸٦/٦۲۰۰
تعداد	٤	٤	تعداد	۳	۳	تعداد	٥	٥
انحراف معیار	۰/۸۲۲٦	۰/۳۷۷۱۳	انحراف معیار	۰/۲٥۰۰٦	۰/٥۷۷۳٥	انحراف معیار	۰/۳٥۰۷۱	۰/٤۷٦٤٥
خطای معیار	۰/٤۱۱۳	۰/۱۸۸٥٦	خطای معیار	۰/۱٤٤٥٤۷	۰/۳۳۳۳۳	خطای معیار	۰/۱٥٦۸٤	۰/۲۱۳۰۷
حداقل	۸۳/۷	۸۷/۲۰	حداقل	۸٥/٥	۸٦/۰۰	حداقل	۸٥/۲	۸٦/۰۰
حداکثر	۸٥/٥	۸۸/۰۰	حداکثر	۸٦	۸۷/۰۰	حداکثر	۸٦	۸۷/۳۰
پایین‌ترین باند	۸۳/٤٤۱۱	۸۷/۱۳۲٤	پایین‌ترین باند	۸٥/۲۷٦۰	۸٥/۲۳۲٤	پایین‌ترین باند	۸٥/۲۰٤٥	۸٦/۰۲۸٤
بالاترین باند	۸٦/۰٥۸۹	۸۸/۳۳۲٦	بالاترین باند	۸٦/۰۳۱۲	۸۸/۱۰۰۹	بالاترین باند	۸٦/۰۷٥٥	۸۷/۲۱۱٦
Montivipera albicornata			*Spalerosophis diadema*			*Telescopus spp.*		
میانگین	۸٥/۲۳۳۳	۸٦/٦۷۳۳	میانگین	۸٦/٦	۸۷/۲۰۰۰	میانگین	۸٦/۲٥	۸۷/۷٥۰۰
تعداد	٦	٦	تعداد	۲	۲	تعداد	۲	۲

۰/٦۳٦٤۰	۰/۰۷۰۷۱	انحراف معیار	۰/۷۰۷۱۱	۰/۱٤۱٤۲	انحراف معیار	۰/٦٤۳۰٤	۰/۲۸۰٤۸	انحراف معیار
۰/٤٥۰۰۰	۰/۰٥	خطای معیار	۰/٥۰۰۰۰	۰/۱	خطای معیار	۰/۲٦۲٥۲	۰/۱۱٤٥	خطای معیار
۸۷/۳۰	۸٦/۲	حداقل	۸٦/۷۰	۸٦/٥	حداقل	۸٦/۰۰	۸٤/۸	حداقل
۸۸/۲۰	۸٦/۳	حداکثر	۸۷/۷۰	۸٦/۷	حداکثر	۸۷/۷۰	۸٥/٥	حداکثر
۸۲/۰۳۲۲	۸٥/٦۱٤۷	پایین‌ترین باند	۸۰/۸٤٦۹	۸٥/۳۲۹٤	پایین‌ترین باند	۸٥/۹۹۸٥	۸٤/۹۳۹	پایین‌ترین باند
۹۳/٦٤۷۸	۸٦/۸۸٥۳	بالاترین باند	۹۳/٥٥۳۱	۸۷/۸۷۰٦	بالاترین باند	۸۷/۳٤۸۲	۸٥/٥۲۷۷	بالاترین باند

Natrix tessellate			*Hemorrhois ravergieri*			*Platyceps rhodorachis*		
۸۷/٦٦٦۷	۸٥/۱	میانگین	۸۷/٥٦٦۷	۸٦/۸۳۳۳	میانگین	۸٥/۸۷٥۰	۸٥/۸۷٥	میانگین
۳	۳	تعداد	۳	۳	تعداد	٤	٤	تعداد
۱/٦٥۰۲٥	۰/٦۰۸۲۸	انحراف معیار	۰/٥۱۳۱٦	۰/۱٥۲۷٥	انحراف معیار	۰/۲۹۸٦۱	۰/۱٥	انحراف معیار
۰/۹٥۲۷۷	۰/۳٥۱۱۹	خطای معیار	۰/۲۹٦۲۷	۰/۰۸۸۱۹	خطای معیار	۰/۱٤۹۳۰	۰/۰۷٥	خطای معیار
۸٦/۰۰	۸٤/۷	حداقل	۸٦/۰۰	۸٦/۷	حداقل	۸٥/٥۰	۸٥/۷	حداقل
۸۹/۳۰	۸٥/۸	حداکثر	۸۷/۰۰	۸۷	حداکثر	۸٦/۲۰	۸٦	حداکثر
۸۳/٥٦۷۲	۸۳/٥۸۹	پایین‌ترین باند	۸٥/۲۹۱۹	۸٦/٤٥۳۹	پایین‌ترین باند	۰/۳۹۹۸	۸٥/٦۳٦۳	پایین‌ترین باند
۹۱/۷٦٦۱	۸٦/٦۱۱	بالاترین باند	۸۷/۸٤۱٤	۸۷/۲۱۲۸	بالاترین باند	۸٦/۳٥۰۲	۸٦/۱۱۳۷	بالاترین باند

Eryx sp			*Erix miliaris*			*Typhlops vermicularis*		
۸٤/۸٥۰۰	۸٦/۷٥	میانگین	۸٤/۳۳۳۳	۸٦/۷۳۳۳	میانگین	۸۲/۹٥۰۰	۸٦/۳	میانگین
۲	۲	تعداد	۳	۳	تعداد	٤	٤	تعداد
۱/۲۰۲۰۸	۰/۳٥۳٥٥	انحراف معیار	۰/٤۷۲٥۸	۰/۰٥۷۷٤	انحراف معیار	۰/۱۰۰۰۰	۱/۰۷۳۹۳	انحراف معیار
۰/۸٥۰۰۰	۰/۲٥	خطای معیار	۰/۲۷۲۸٥	۰/۰۳۳۳۳	خطای معیار	۰/٥۰۰۰	۰/٥۳٦۹۷	خطای معیار
۸٤/۰۰	۸٦/٥	حداقل	۸۳/۸۰	۸٦/۷	حداقل	۸۲/۸۰	۸٤/۷	حداقل
۸٥/۷۰	۸۷	حداکثر	۸٤/۷۰	۸٦/۸	حداکثر	۸۳/۰۰	۸۷	حداکثر
۷٤/۰٤۹۷	۸۳/٥۷۳٤	پایین‌ترین باند	۸۳/۱٥۹٤	۸٦/٥۸۹۹	پایین‌ترین باند	۸۲/۷۹۰۹	۸٤/٥۹۱۱	پایین‌ترین باند
۹٥/٦٥۰۳	۸۹/۹۲٦٦	بالاترین باند	۸٥/٥۰۷۳	۸٦/۸۷٦۸	بالاترین باند	۸۳/۱۰۹۱	۸۸/۰۰۸۹	بالاترین باند

95% Confidence Interval for Mean						Total		
بالاترین باند	پایین‌ترین باند	حداکثر	حداقل	خطای معیار	انحراف معیار	تعداد	میانگین	ژن
۸٦/۲۹۱۱	۸۳/۹۷٤٥	۸۸	٥۳	۰/٥۷۸٤٤	٤/٤۰٥۲۸	۸٥/۱۳۲۸	٥۸	16 S
۸٦/۷٤۷۳	۸٦/۰۱٥۸	۸۹/۳۰	۸۲/۸۰	۰/۱۸۲٦٥	۱/۳۹۱۰۱	۸٦/۳۸۱٦	٥۸	Cytb

جدول ٤- آزمون برابری گروه‌ها

		مجموع مربعات	درجه آزادی	مربع میانگین	F	Sig.
16 S	بین گروهی	۳۸۱/٦۳۳	۱٤	۲۷/۲٦۰	۱/٦۱۸	۰/۱۱۳
	درون گروهی	۷۲٤/٥۳٥	٤۳	۱٦/۸٥۰		
	کل	۱۱۰٦/۱٦۸	٥۷			
Cytb	بین گروهی	۸۷/۳٥٥	۱٤	٦/۲٤۰	۱۱/٦۹۸	۰/۰۰۰
	درون گروهی	۲۲/۹۳٦	٤۳	۰/٥۳۳		
	کل	۱۱۰/۲۹۱	٥۷			

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'AACCACCGTTGTTCATCAACTACAAAAACATGTCCAACCAACATGTCCTTCTAACATCCAATC
TTCTTCCTGTTGGATCCAACATCTCTACCTGATGAAATTTTGGCTCTATACTACTAGCTTCCTAA
TACTACAAATTATAACCGGATTCTTCCTAGCAATTCACTACACAGCCAACATTAACCTAGCCTT
CTCATCAGTGATTCACATCACGCGGGACGTACCTTACGGGTGAATCATACAAAACCTTCACACA
ATCAGCGCCTCCCTATTCTTCATCTGTATCTACACCCATATCGCACGAGGACTCTACTATGGTTT
ATACCTAAATAAAGAAGTTTGACTATCAGGAACAGCCCTCCTGGTTATCCTTATAGCAACAGCC
TTCTTCGGATACGTCCTCCCATGAGGACAAATATCATTCTGAGCAGCAACAGTAATCACC -3'
16 S:
5'CGACTGTTTAACAAAAACATAACCTTTAGTCAATAAACCAATATTAAAGGCAACGCCTGCCCA
GTGAACAATTTAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCACAATCACTTGtCTATTAA
TTGTAGACCTGTATGAAAGGCAAAACGAGGGCCTATCTGTCTCTTGTAGTAAATCAATTAAACT
GATCTCCCAGTCCAAAAGCTGGGATGCCAACATAAGACCAGAAGACCCTGTGAAGCTTAAACT
AAACTATTAAATCCTATAATAGCTCCTTTCGGTTGGGGCGACCCTGGAAAAAAAAAAGAACTTCC
AAACATACTGACCTTACAGTCACCTACCCTAGGCCAACAAGCCTAACAACGACCCAGCACAGCt
GATAATTGAACCAAGTTACTCCAGGGATAACAGCGCTATCTTCTTCAAGAGCCCATATCAAAAA
GAAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAGCCGCTATTAAGGGTTCG
TTTGTTCAACGATTAACAGTCCCACGTGATCTGAGTTCAGACCGG-3'

بحث

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 (فیلوژنی) 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 رده بندی بر اساس DNA وجود ندارد و اغلب وابسته به تعدادی عوامل از جمله: تجهیزات آزمایشگاهی، محدودیت‌های مالی، تخصص‌های 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 توالی یابی (next generation sequencing – NGS) هنوز محدودیت دسترسی ارزان قیمت به امکانات توالی یابی از مهمترین موانع می باشد (۱۳).

مطالعه‌ی حاضر اولین مطالعه‌ی شناسایی گونه‌ها است که قابلت 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

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 ٦٤ 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 ٤ نمونه مجهول به درستی تشخیص داده شد و بطور کلی به نظر می‌رسد نمونه‌های مجهول با دقت حدود ۵۰٪ به درستی تشخیص داده شده اند. در حالیکه با استفاده از نقشه مختصات دمای ذوب ۳ نمونه از ٤ نمونه مجهول با اطمینان بالایی و به درستی شناسایی شدند. در حالیکه یک نمونه اگرچه با اطمینان کمتری (به دلیل فاصله نسبتاً زیاد از موقعیت-های 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.

مورد جالب توجه در این بررسی آن است که آخرین تاکسون مورد مطالعه در زمان انجام این پژوهش بر اساس نمونه‌برداری‌های 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 می شود 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 می رفت. در مطالعات بعدی آزمایشگاه با استفاده از مورفومتری و داده های 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 داده های 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 *Pseudocerstes urarachnoides* دیده می‌شود. اگرچه این مورد به احتمال بسیار زیاد به واسطه آلودگی در PCR می‌باشد چرا که هریک از ژن‌ها در همه گونه های 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 می-تواند 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

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 منطقاً 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 می شود که با استفاده از دستگاه HRM که دارای حساسیت خیلی بالایی بوده و دقت سنجش T_m را در حد صدم درجه سانتیگراد به‌دست خواهد داد، میزان حساسیت و دقت روش پیشنهادی این مطالعه می تواند بطور قابل ملاحظه ای 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. *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., PanneerchelvamS., 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., 2nd. 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. NewYork. 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.

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.

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.