مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 3، شماره 2، پاییز و زمستان 1390)

تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه D-Loop از DNA میتوکندری پلنگ ایرانی

محمدرضا نصیری[1و2]، سید امیر رضا پریزاده[*3]، مرتضی مهدوی[3]، حمید آریان نژاد[4]

[1]دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
[2]دانشیار، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی کشاورزی و دامی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد
[3]دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد
[4]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: 1390/11/14، تاریخ پذیرش: 1390/11/27

چکیده

پلنگ ایرانی (*Panthera pardus saxicolor*) بزررگترین زیر گونه پلنگ در دنیا محسوب می شود. اما با توجه به کاهش شدید جمعیت و انقراض آن در برخی مناطق، توجه بیشتر به این زیر گونه خصوصا از دیدگاه ژنتیک حفاظتی دارای اهمیت زیادی می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ناحیه D-Loop ازDNA میتوکندری پلنگ ایرانی بود. برای انجام این تحقیق تعداد 6 نمونه بیولوژیک که شامل استخوان و پوست بود از پارک ملی تندوره استان خراسان رضوی طی سالهای 1387 تا 1390 جمع آوری شد. پس از استخراج DNA تکثیر قطعه 800 جفت بازی از ناحیه D-Loop میتوکندری با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز و پرایمرهای عمومی L15926 وH16498 براساس روش استاندارد انجام گردید. توالی یابی ناحیه تکثیر شده با استفاده از دستگاه خودکار ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر صورت گرفت و به منظور تعیین فاصله ژنتیکی با توالی های حاصل از مطالعات دیگر، مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در بین توالی های نوکلئوتیدی نمونه های مورد مطالعه، تفاوت هاپلوتایپی وجود نداشت. همچنین نتایج آزمون فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining نشان داد که پلنگ ایرانی در گروه *P. pardus saxicolor* قرار می گیرد و از لحاظ هاپلوتایپی مشابه زیر گونه می باشد.

کلید واژه ها: *پلنگ ایرانی، DNA میتوکندری، D-Loop، درخت فیلوژنتیک، Panthera pardus saxicolor.*

[*] نویسنده مسئول: سید امیر رضا پریزاده تلفن: 05118796845 Email:amirreza_prz@yahoo.com

مقدمه

پلنگ با نام علمی (*Panthera pardus*) جزء خانواده Felidae و جنس *Panthera* می باشد. هنگامی که نام پلنگ ایرانی (Persian Leopard) برده می شود منظور زیرگونه *Panthera pardus saxicolor* است. پلنگ ایرانی یکی از بزرگ جثه ترین زیرگونه های پلنگ در دنیا است. این زیر گونه در کوهستان های کشورهای ایران ، افغانستان، ترکمنستان، آذربایجان، گرجستان و ارمنستان زیست می کند (Khorozyan *et al*., 2005). جمعیت این زیر گونه در دنیا از 1300 قلاده تجاوز نمی کند و ایران بزرگترین جمعیت این زیر گونه را در خود جای داده است که حدود 550 تا 850 قلاده را شامل می شود (Kiabi *et al*., 2002; Sanei, 2007). اولین گزارش مربوط به پلنگ در ایران، توسط Blanford (1873) ارائه شده است. در حال حاظر از تمامی پلنگ های ایران با عنوان زیر گونه ای از پلنگ، تحت عنوان *saxicolor* یاد می شود. این زیر گونه اولین بار توسط Pocock (1927) شناسایی شد و در سال های اخیر اعتبار این زیرگونه مورد تایید قرار گرفته است. تا قبل از سال 2000 تصور بر این بود که پلنگ های قلمرو ایران متعلق به سه زیرگونه *P.p.saxicolor*، *P.p.dathei* و *P.p.ciscaucasica* می باشند (Nowell & Jackson, 1996). اما یک بررسی ژنتیکی و ریخت شناسی وجود دارد که بیان می کند *dathei* نام معتبری نیست و به نظر می رسد *ciscaucasica* مترادف *saxicolor* باشد. امروزه این نظریه پذیرفته شده می باشد (Miththapala, 1992; Khorozyan *et al*., 2005). از این رو بهتر است هم پلنگ های کوچک تر و تیره تر جنوب و هم پلنگ های بزرگ تر و روشن تر شمال ایران همگی تحت نام *saxicolor*آورده شوند. مطالعات صورت گرفته در زمینه رده بندی پلنگ ایران بسیار محدود بوده و فقط شامل بررسی های انجام شده توسط Miththapala *et al.* (1996) و Uphyrkina *et al.* (2001) می باشند که به صورت ضمنی پلنگ ایرانی را از لحاظ ژنتیکی با دیگر گونه ها مقایسه نموده اند. البته بررسی های ژنتیکی صورت گرفته در دیگر اعضای جنس Panthera نیز گستره وسیعی ندارد و شامل مواردی مانند توالی یابی DNA میتوکندری و استفاده از مارکرهای ریز ماهواره ای بر روی پوز پلنگ وحشی (Cheetah) آسیایی و آفریقایی (Charruau *et al*., 2011) ، توالی یابی کامل دو ژن میتوکندری ND2 و ND5 و همچنین اینترون7 ژن هسته ای β- فیبرینوژن در خانواده Panthera (Yu & Zhang, 2005) و مطالعه 4 هزار جفت باز از DNA میتوکندری و 30 جایگاه ریز ماهواره ای در بین زیرگونه های پلنگ را شامل می شود (Luo *et al*., 2004). گستره زیستگاه پلنگ ایرانی شامل نواحی وسیعی از شمال تا جنوب ایران می شود (Sanei & Zakaria, 2011a) (شکل 1). زیر گونه پلنگ ایرانی یکی از 9 زیر گونه ای می باشد که طی مطالعات ژنتیکی (Miththapala *et*

al., 1996; Uphyrkina *et al*., 2001) بـرای گونـه *Panthera pardus* معرفـــی شـــده اســـت.

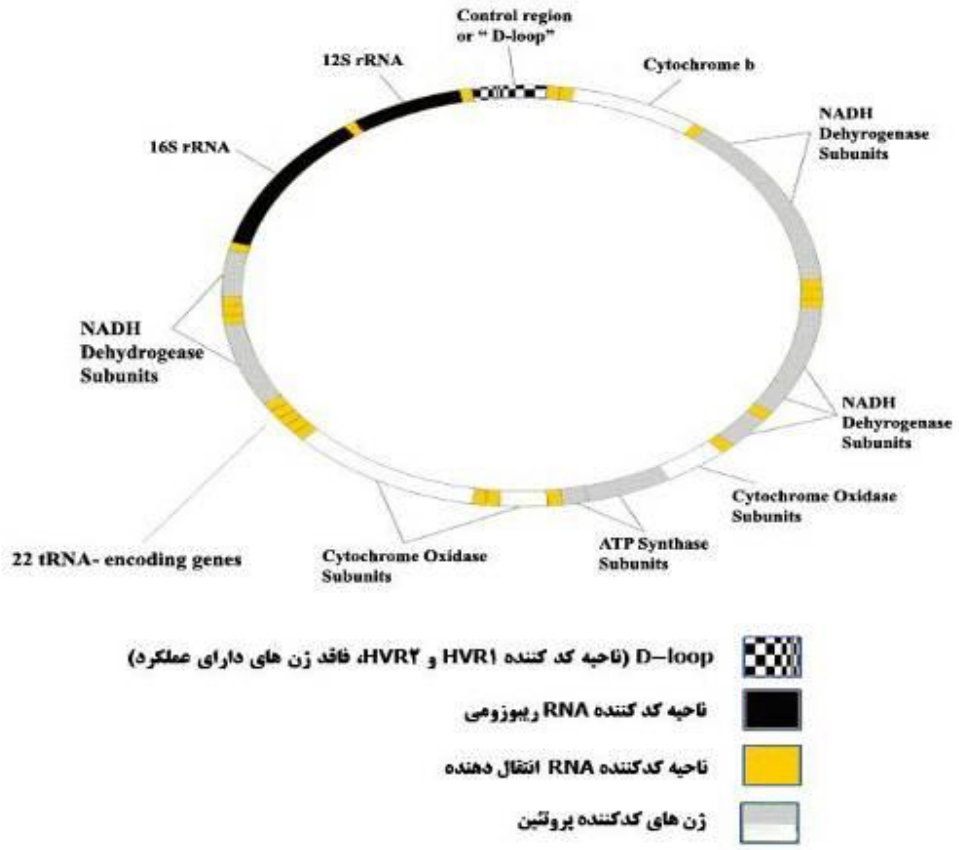
شکل 1- پراکندگی جغرافیایی پلنگ ایرانی (Sanei & Zakaria, 2011a).

Figure 1- Geographic distribution of the Persian Leopard (Sanei & Zakaria, 2011a).

پس از انقراض شیر ایرانی (*Panthera leo persica*) و ببر ایرانی (*Panthera tigris virgata*)، پلنـگ ایرانـی بـه عنـوان آخـرین بازمانـده جـنس *Panthera* در ایران مورد توجه خاصی قرار گرفتـه است. Firouz (2005) پلنگ را در تمام زیستگاهها، بویژه در بیابانهای مرکـزی ایـران در خطـر انقـراض توصیف مـی کنـد. طبـق قـانون حفاظـت از حیـات وحش ایران این زیر گونه جـزو حیوانـات حفاظـت شده محسوب می گردد و توسـط اتحادیـه جهـانی حفاظت از طبیعـت (IUCN)[1] بـه عنـوان یـک زیـر گونه در خطر انقراض معرفـی شـده اسـت. از ایـن بابت شناسایی دقیق این گونه در جهت حفاظـت از آن بسیار حائز اهمیت اسـت. روش هـای مولکـولی مانند توالی یابی ژنوم میتوکندری یکـی از کـاربردی ترین روشـها بـرای تعیـین رابطـه فیلـوژنتیکی بـین جمعیت ها و گونه‌هـای نزدیـک بـه هـم محـسوب مـــی‌شـــود (Bruford *et al*., 2003). DNA میتوکندری (mtDNA) کـه سـاختار حلقـوی آن در

[1] International Union for Conservation of Nature

شکل 2 نشان داده شده است، در تشخیص گونه ها و ترسیم رابطه فیلوژنتیکی دارای مزایایی از جمله تعداد زیاد نسخه به ازای هر سلول، اندازه کوچکتر آن از DNA ژنومی، وراثت پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی در آنها، وجود نواحی حفاظت شده و وجود نواحی حفاظت نشده‌ای مانند ناحیه D-Loop برای مطالعات تکاملی گونه‌های وابسته می‌باشد (Bellagamba *et al.*, 2001). از این رو mtDNA نشانگر بسیار مناسبی برای تشخیص بین گونه‌ای گروه‌هایی است که حدود 100 تا 10000 سال قبل از هم جدا شده اند. لذا با استناد به موارد ذکر شده و اهمیت حفاظت ژنتیکی و کاهش شدید جمعیت پلنگ ایرانی و انقراض آن در برخی مناطق، هدف از این مطالعه بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه D-Loop از DNA میتوکندری پلنگ ایرانی بود.



شکل 2. تصویر شماتیک ساختار حلقوی DNA میتوکندری که حاوی 22 ناحیه ژنی کد کننده tRNA و 13 ناحیه کد کننده پروتئین می باشد.

Figure 2- Schematic structure of circular mitochondrial DNA that it is containing the 22 gene coding regions for tRNA and 13 protein-coding regions.

مواد و روش ها

تعداد 6 نمونه بیولوژیکی (استخوان و پوست) از جمعیت پلنگ های پارک ملی تندوره در استان خراسان رضوی در طول سال های 1387 تا 1390 جمع آوری شد. استخراج DNA، پس از هموژنیزه کردن نمونه ها با نیتروژن مایع و به کمک کیت Wizard Genomic DNA Purification Kit SV محصول شرکت Promega طبق دستوالعمل شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف سنجی، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND-2000 شرکت THERMO آمریکا تعیین شد. برای تکثیر ناحیه D-Loop از DNA میتوکندری به طول 800 جفت باز از یک جفت پرایمر عمومی[1] به نام های L15926 با توالی- 5` - ATATACTGGTCTTGTAAACC 3` و H16498 با توالی - 5` CCTGAAGTAGGAACCAGATG -3 استفاده شد (Kocher *et al*., 1989; Meyer *et al*., 1990). واکنش زنجیره ای پلیمراز توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal در 35 سیکل و با حجم نهایی 25 میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش PCR و غلظت مواد عبارت بود از 100 نانوگرم DNA ژنومی، یک واحدآنزیم *Taq* پلیمراز، 0/5 میکرولیتر dNTPs 10میلی مولار ، 1 میکرولیتر $MgCl_2$ 50 میلی مولار،1 میکرولیتر مخلوط پرایمر 5 پیکومولار، 2/5 میکرولیتر بافر 10x و 18 میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. برنامه حرارتی واکنش PCR به شرح جدول 1 می باشد. به منظور تایید تکثیر ناحیه مورد نظر، طی واکنش های PCR، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز 1/5 درصد با رنگ آمیزی SYBR Safe صورت گرفت. مقدار 100 میکرولیتر از محصولات PCR، خالص سازی شد و به همراه 50 میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت 10 پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شدند. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی گردیدند. با استفاده از ابزار BLAST و روش blastn در پایگاه NCBI میزان همپوشانی و هومولوژی توالی‌های بدست آمده سنجیده شد. به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی گونه مورد مطالعه، ماتریس فواصل ژنتیکی به کمک الگوریتم ارائه شده توسط Tamura *et al*. (2004)، بوسیله نرم افزار Mega v.5 مورد محاسبه قرار گرفت (Tamura *et al*., 2011). همچنین از روش Neighbor-Joining و Disparity Index Analysis این برنامه، به ترتیب برای ترسیم نمودار درختی و تعیین هاپلوتیپ‌ها استفاده شد. از الگوریتم و نرم افزار PHRED (Ewing & Green, 1998) به منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی ها استفاده شد. برای ثبت توالی نهایی به دست آمده از نرم افزار Sequin v10 استفاده شد.

[1] Universal Primer

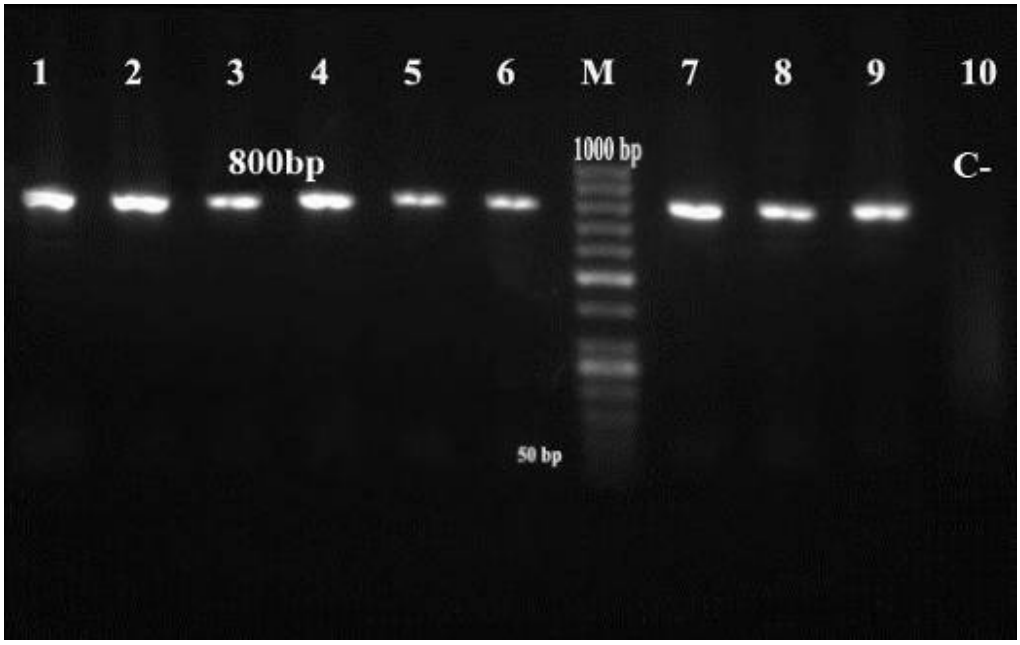
جدول 1- برنامه حرارتی، برای تکثیر قطعه 800 جفت بازی ناحیه D-Loop از DNA میتوکندری.

Table 1- Thermal program for amplification 800bp fragment of the mitochondrial control region

Stage مرحله	Predenature واسرشت اولیه	Denature واسرشت	Annealing اتصال	Extension تکثیر	Final extension تکثیر نهایی
Temp (c) دما (سانتیگراد)	94	94	57	72	72
Time (sec) زمان (ثانیه)	300	30	30	45	600

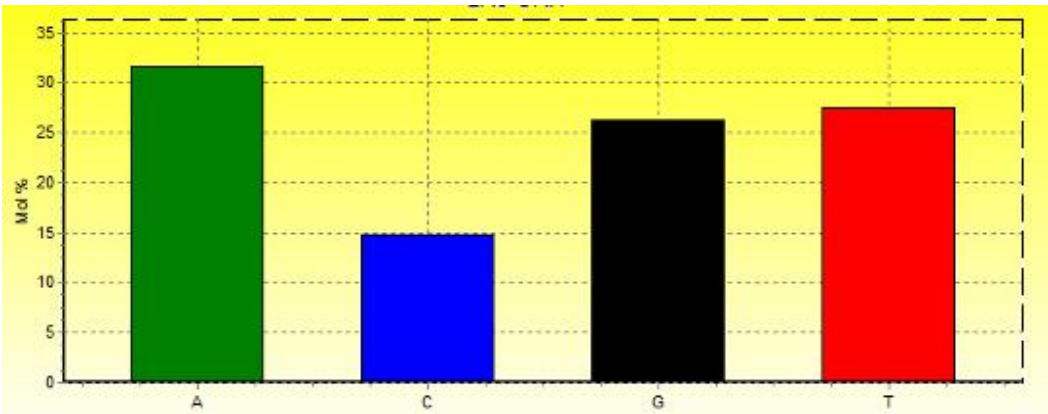
نتایج و بحث

استخراج DNA از نمونه های بیولوژیکی استخوان و پوست در تمامی نمونه ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار است. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل آگارز 1/5 درصد نشان داد که پرایمرها به خوبی فعالیت نموده و قطعات اختصاصی برای ناحیه D-Loop که شامل ژن های دو ناحیه HVR1 و HVR2 به طول 800 جفت باز می باشد، تولید شده است (شکل 3). وجود کنترل منفی پاک و قطعات اختصاصی، نشان از دقت و صحت انجام واکنش داشت. علاوه بر این، وجود یک باند اختصاصی نشان داد که توالی مشابه‌ای برای جفت شدن آغازگرهای مورد استفاده در محل‌های دیگر ژنوم وجود نداشته است. نتایج توالی یابی نشان داد که سه نمونه از شش نمونه دارای کیفیت بسیار پایینی می باشند و از این لحاظ در ادامه بررسی ها از آنها استفاده نشد. از طرفی پس از محاسبه کیفیت توالی یابی، نوکلئوتیدهایی که دارای کیفیت پایینی بودند از دو انتهای توالی ها حذف شدند و نواحی مشترک بین سه توالی جداسازی شد. نتیجه این کار منجر به تولید سه قطعه با طول 328 نوکلئوتید گردید. ترکیب نوکلئوتیدی توالی های مورد مطالعه نیز مورد محاسبه قرار گرفت (شکل 4). نتایج نشان دهنده فراوانی 41% نسبت G+C و 59% نسبت A+T می-باشد.



شکل 3- الکتروفورز محصولات PCR برای ناحیه کنترل میتوکندریایی به طول 800 جفت باز، نشانگر کیفیت مناسب قطعات تکثیر شده می باشد.(نشانگر وزنی 50 جفت بازی=M، کنترل منفی= -C)

Figure 3- Electrophoresis of 800bp PCR products on 1.5% agarose gel, showed that amplified fragments have good quality.(M = 50bp size marker, C- = negative control).



شکل 4- ترکیب نوکلئوتیدی توالی های مورد مطالعه در پلنگ ایرانی

Figure 4- Nucleotide composition of Persian leopard sequences.

مقایسه بین این سه توالی با استفاده از ابزار Disparity Index Analysis نرم افزار MEGA، نشان دهنده عدم وجود اختلاف بین آنها بود (P=0). در نتیجه می توان گفت جمعیت مورد مطالعه فاقد تنوع هاپلوتیپی بود. با مقایسه بین توالی های مورد مطالعه با توالی های موجود در پایگاه

NCBI مشخص شد که میزان هم پوشانی[1] پایین و هومولوژی[2] بالایی بین توالی های موجود در این پایگاه با توالی های مورد مطالعه ما وجود دارد. این بدان مفهوم است که بخش های توالی یابی شده از ناحیه D-Loop در مطالعه حاضر، متفاوت از بخش هایی می باشد که در مطالعات دیگر مورد استفاده قرار گرفته است (هم پوشانی پایین). از طرفی میزان همسانی این توالی در مناطقی که هم پوشانی وجود دارد بسیار بالاست (هومولوژی بالا). یکی دیگر از دلایلی که منجر به این امر می شود، راندمان پایین و مشکلات پیچیده استخراج DNA از نمونه های استخوان و پوست و تکثیر قطعات حاصله می باشد (Vural & Tirpan, 2010). چنین قطعاتی باعث افت کیفیت توالی یابی شده و منجر به عدم توالی یابی برخی نوکلئوتیدها و همچنین حذف بسیاری از نوکلئوتیدهای توالی یابی شده می گردد. به طور کل می توان گفت؛ اندازه قطعات DNA حاصله از نمونه های اسکلتی، معمولا کوتاه می باشد (O'Rourke *et al.*, 2000). قطعات مورد مطالعه بیشترین سطح هم پوشانی را با توالی کامل میتوکندریایی *Panthera pardus* نشان دادند. این توالی 97% هم پوشانی و در عین حال 97% هومولوژی را با توالی ما داشت. در عین حال توالی های یافت شده از دیگر گونه های جنس *Panthera*میزان هم پوشانی کمتر از 90% را با توالی های مورد مطالعه ما نشان می دهند. بررسی توالی های موجود از گونه *pardus* و زیر گونه های آن حاکی از میزان هم پوشانی بسیار پایین در سطح 20% و در عین حال میزان هومولوژی بالا در سطح 99 تا 100% می باشند. در نتیجه برای مقایسات بین گونه ای، از هم پوشانی حدود 300 نوکلئوتیدی و برای مقایسات بین زیر گونه ای از توالی 69 نوکلئوتیدی استفاده شد. محاسبه ماتریس فواصل ژنتیکی در بررسی بین گونه ای نشان دهنده تعلق گونه مورد مطالعه، به گونه *Panthera pardus* می باشد (جدول 2).

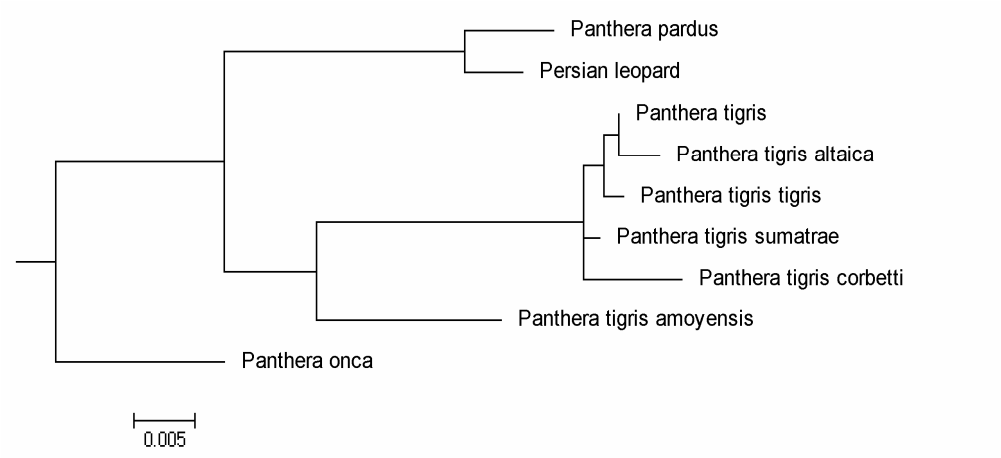
همانطور که مشاهده می شود کمترین فاصله ژنتیکی گونه مورد مطالعه با گونه *Panthera pardus* می باشد که معادل 0/0211 است. ترسیم درخت فیلوژنتیک نیز صحت این گفته ها را تایید می کند (شکل 5). مطالعات درون گونه ای با مقایسه حدود 70 نوکلئوتید از زیر گونه های مختلف گونه *Panthera pardus* با توالی مورد مطالعه صورت گرفت. نتایج مقایسه نشان دهنده وجود هموژنیسیته بالا بین توالی ها و وجود دو هاپلوتایپ در بین آنها بود (شکل 6). همانطور که در شکل پیداست یک جهش از نوع جایگزینی متقاطع[3] در جایگاه 38 منجر به جایگزینی دو نوکلئوتید آدنین و گوانین با هم شده است. با توجه به حفظ این جهش ها در طول نسل های مختلف، انتظار می رود افرادی که از لحاظ این جایگاه مشابه هم باشند دارای خواستگاه مشترکی نیز باشند.

[1] Coverage
[2] Homology
[3] Transversion substitution

جدول 2- فواصل ژنتیکی بین توالی های مورد مطالعه پلنگ ایرانی و دیگر گونه های پلنگ.

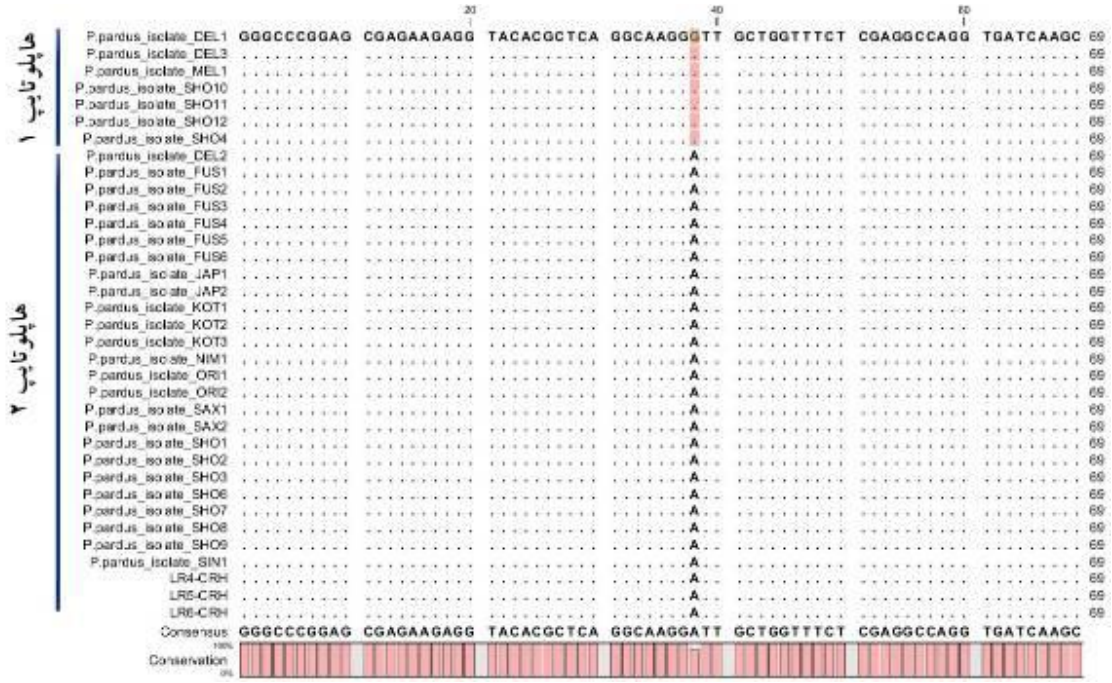
Table 2- Genetic distances between sequences of the Persian leopard and other species of leopard. 1:Panthera pardus, 2: Persian leopard, 3: Panthera tigris, 4: Panthera tigris altaica, 5: Panthera tigris tigris, 6: Panthera tigris sumatrae, 7: Panthera tigris corbetti, 8: Panthera tigris amoyensis. 9: Panthera onca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1									
2	0.0211								
3	0.1186	0.1196							
4	0.1254	0.1265	0.0052						
5	0.1186	0.1196	0.0052	0.0104					
6	0.1121	0.1130	0.0104	0.0157	0.0052				
7	0.1253	0.1263	0.0157	0.0210	0.0104	0.0157			
8	0.0858	0.0865	0.0665	0.0724	0.0724	0.0665	0.0783		
9	0.0618	0.0556	0.0608	0.0667	0.0667	0.0608	0.0726	0.0548	0.0618



شکل 5- درخت فیلوژنتیک پلنگ ایرانی

Figure 5- Phylogenetic tree of the Persian Leopard



شکل 6- توالی های نوکلئوتیدی بخشی از ناحیه D-Loop مورد مطالعه (LR4-CRH, LR5-CRH and LR6-CRH) و هم ردیف سازی آن با زیر گونه های دیگر پلنگ، نشان دهنده وجود دو هاپلوتایپ می باشد.

Figure 6- Nucleotide sequences of the mitochondrial control region (D-Loop) from studied Persian Leopard (LR4-CRH, LR5-CRH and LR6-CRH), after alignment with other subspecies shown two different haplotypes.

با توجه به میزان پایین هم پوشانی بین توالی های موجود از زیر گونه های *Panthera pardus* و توالی مورد مطالعه نمی توان بررسی دقیق تری در مورد زیر گونه پلنگ ایرانی از بعد ژنتیکی انجام داد، زیرا احتمال وجود تفاوت ژنتیکی بین توالی ها با کاهش سطح هم پوشانی آنها کاهش می یابد و این تفاوت های ژنتیکی اساس مقایسات فیلوژنتیکی می باشند. همانطور که پیداست این زیر گونه در هاپلوتایپ مشترکی با زیر گونه *saxicolor* قرار دارد. در مورد رده بندی پلنگ ایرانی و جایگاه آن در بین گونه و زیر گونه های پلنگ، مطالعات مختلفی انجام شده است و بر اساس مطالعات ریخت شناسی[1] تصور می شود که باید در زیر گونه *P. p. saxicolor* جای بگیرد (Khorozyan *et al.*, 2006). با این حال تا کنون هیچ مطالعه ژنتیکی بر روی پلنگ ایرانی با هدف تعیین جایگاه آن در بین دیگر زیر گونه ها صورت نپذیرفته است. در یک تحقیق، Miththapala *et al.* (1996) به کمک روش های RFLP، آلوزایم ها و ریز ماهوارک ها[2]،

[1] Morphology
[2] Minisatellite

بر روی گونه *P. pardus* مطالعه ای انجام دادند و بر اساس شواهد حاصله، هشت زیر گونه برای آن پیشنهاد کردند. در این تقسیم بندی نمونه های پلنگ ایرانی که از نواحی شمالی ایران به دست آمده بود به عنوان زیر گونه *saxicolor* مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه ای دیگر که توسط Uphyrkina *et al*. (2001) به کمک 25 جایگاه ریزماهواره ای[1] و همچنین توالی یابی بخش هایی از ناحیه D-Loop و *NADH5* بر روی این گونه انجام شد، 9 زیر گونه در این گونه تعریف شد. در این مطالعه نمونه های زیرگونه *saxicolor* از باغ وحش های مناطق مختلف دنیا جمع آوری شده بود و هر چند که منشا اصلی آنها مشخص نبود، ولی نویسندگان محدوده احتمالی جغرافیایی این نمونه ها را آسیای مرکزی اعلام نمودند. با توجه به این که تا اواخر دهه 1950، پلنگ های تحویل داده شده به باغ وحش های فرانسه و آلمان از نواحی شمال و شمال شرقی بوده اند (Zukowsky, 1959) و همچنین تمامی مولدین جمعیت پلنگ ایرانی در باغ وحش های جهان طی سال های 1955 تا 1967 از نواحی شمالی ایران گرفته شده بودند (Shoemaker, 1985)، انتظار می رود که نمونه های مورد استفاده در این مطالعه نیز از گونه پلنگ ایرانی واقع در نواحی شمالی باشند. همچنین در این مطالعه زیر گونه *P. p. sindica* که به پلنگ بلوچستان نیز شهرت دارد و خواستگاه آن افغانستان می باشد با زیر گونه *saxicolor* ادغام شده است. با توجه به اینکه Khorozyan *et al*. (2006) قبلا بیان نموده بود که زیر گونه *P. p. ciscaucasica* در واقع نام سابق *saxicolor* می باشد. همچنین *P. p. dathei* نیز فقط بر اساس یک نمونه پوست شناسایی شده است و احتمالا معتبر نیست. در نتیجه همه این چهار زیر گونه همان زیر گونه *saxicolor* می باشند و تمامی پلنگ های ایرانی متعلق به همین زیر گونه هستند. در تمامی بررسی های ژنتیکی صورت گرفته در گونه پلنگ، فرض بر آن بوده که پلنگ ایران متعلق به زیر گونه *saxicolor* می باشد و از آن فقط به عنوان نماینده این زیر گونه استفاده شده است. از طرفی در هر دو مطالعه فقط 8 تا 12 نمونه مورد استفاده قرار گرفته که یا منشا دقیق آنها مشخص نبوده و یا از مناطق شمال شرقی ایران بوده است. این در حالی است که زیستگاه پلنگ در ایران شامل نواحی گسترده ای در شمال، مرکز و جنوب ایران می باشد (Sanei & Zakaria, 2011b). در نتیجه انجام یک مطالعه بر روی پلنگ ایرانی در نواحی جغرافیایی مختلف ضروری می باشد. قائدتاً مهم ترین مانع برای این کار تهیه نمونه است. این در شرایطی است که حتی تهیه عکس از پلنگ ایرانی نیز کاری دشوار است. هر چند که در بین نشانگرهای ژنتیکی، توالی یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی ترین روشها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود، ولی باید به

[1] Microsatellite

محدودیت های خاصی آن نیز توجه داشت (Funk & Omland, 2003). از آنجا که ناحیه D-Loop یک ناحیه غیر کد کننده می باشد و از این لحاظ کمتر تحت تاثیر عوامل تصحیح کننده ژنوم قرار می گیرد جهش های رخ داده در آن ابقا می شوند و در نتیجه دارای میانگین نرخ جهش بالاتری است. این امر باعث می شود این ناحیه دارای تنوع بالایی در بین گونه ها باشد (Eyre-walker & Awadalla, 2001) و از این دیدگاه، گزینه مناسبی برای بررسی های فیلوژنتیکی محسوب می شود. اما وسعت زیاد این ناحیه و وجود چند دامنه مختلف در آن، باعث دشوار شدن مقایسه بین نتایج حاصل از مطالعات مختلف می شود. یکی از دلایل پایین بودن سطح هم پوشانی توالی های این مطالعه با توالی های موجود دیگر، به همین خاطر است. توصیه می شود بر اساس توالی های پلنگ موجود در پایگاه NCBI، در مطالعات بعدی بخش هایی از ناحیه D-Loop مورد بررسی قرار گیرد که دارای هم پوشانی بالایی با نواحی مطالعه شده دیگر باشد.

سپاس گزاری

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه مسئولان اداره محیط زیست خراسان رضوی و پناهگاه حیات وحش شیراحمد سبزوار و خصوصا جناب آقای مهندس آقامیری، تقی پور، فرجیان و سرکار خانم رامون که در تهیه نمونه و پشتیبانی مالی نقش بسزایی داشتند ابراز می‌دارند.

منابع

Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, Valfare F (2001). Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:75-81.

Blanford WT (1873). Note on the gazelles of lndia and Persia, with description of a new species. Proceedings of the Zoological Society of London, London, pp. 313-319.

Bruford M, Bradley D, Luikart G (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature Reviews Genetics 3:900-910.

Charruau P, Fernandes C, Wengel PO-T, Peters J, Hunter L, Ziaie H, Jourabchian A, Jowkar H, Schaller G, Ostrowski S, Vercammen P, Grange T, Tterer CS, Kotze A, Geigl EM, Walzer C, Burger PA (2011). Phylogeography, genetic structure and population divergence time of cheetahs in Africa and Asia: evidence for long-term geographic isolates. Molecular Ecology 20:706-724.

Ewing B, Green P (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. Genome Research 8:186-194.

Eyre-walker A, Awadalla P (2001). Does human mtDNA recombine? Journal of Molecular Evolution 53:430-435.

Firouz E (2005) The Complete Fauna of Iran. I.B.Tauris, London.

Funk DJ, Omland KE (2003). Species-level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 34:397-423.

Khorozyan I, Malkhasyan A, Asmaryan S (2005). The Persian leopard prowls its way to survival. Endangered Species Update 22:51-60.

Khorozyan IG, Gennady F, Baryshnikov GF, Abramov AV (2006). Taxonomic status of the leopard, Panthera pardus (Carnivora, Felidae) in the Caucasus and adjacent areas. Russian Journal of Theriology 5:41-52.

Kiabi BH, Dareshouri BF, Ghaemi RA, Jahanshahi M (2002). Population status of the Persian leopard (Panthera pardus saxicolor Pocock, 1927) in Iran. Zoology in the Middle East 26:41-47.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989). Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86:6196-6200.

Luo S-J, Kim J-Hu, Johnso WE, Walt Jevd, Yuhki N, Miquelle DeG, kina OU, ch JMG, Quigley HB, Tilson R, Brady G, Martelli P, Subramani V (2004). Phylogeography and Genetic Ancestry of Tigers (Panthera tigris). 2:e442.

Meyer A, Kocher TD, Basasibwaki P, Wilson AC (1990). Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. Nature 347:550-553.

Miththapala S (1992). Genetic and morphological variation in the leopard (Panthera pardus): a geographically widespread species, Ph.D. Thesis. Florida’s University, Gainesville, Florida, USA.

Miththapala S, Seidensticker J, O'brien SJ (1996). Phylogeographic Subspecies Recognition in Leopards (Pantherapardus): Molecular Genetic Variation Conseivation Biology 10:1115-1132.

Nowell K, Jackson P (1996). Leopard Panthera pardus (Linnaeus, 1758) Wild Cats: status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Cat Specialist Group, Switzerland.

O’Rourke DH, Hayes G, Carlyle SW (2000). Ancient DNA Studies in Physical Anthropology. Annual Review of Anthropology 29:217 - 242.

Pocock RI (1927). Description of two subspecies of leopards. Annals and Magazine of Natural History 9:213-214.

Sanei A (2007). Analysis of Leopard (Panthera pardus) Status in Iran vol 1. Sepehr Publication Center, Iran, Tehran (in Farsi).

Sanei A, Zakaria M (2011a). Distribution pattern of the Persian leopard (Panthera pardus saxicolor) in Iran. Asia Life Sciences 7:7-18.

Sanei A, Zakaria M (2011b). Survival of the Persian leopard (Panthera pardus saxicolor) in Iran: Primary threats and human-leopard conflicts. Asia Life Sciences 7:31-39.

Shoemaker AH (1985). 1983 Studbook for rare leopards, Panthera pardus ssp. Zoo Biology 4:169-196.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739.

Uphyrkina O, Johnson WE, Quigley HB, Miquelle DG, Marker L, Bush ME, O'Brien Sj (2001). Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard, Panthera pardus. Molecular Ecology 10:2617.

Vural HC, Tirpan AA (2010). Comparison and Development of A Rapid Extraction Methods of DNA from Ancient Human Skeletal Remains of Turkey. The Internet Journal of Biological Anthropology 4.

Yu L, Zhang Y-p (2005). Phylogenetic studies of pantherine cats (Felidae) based on multiple genes, with novel application of nuclear beta -fibrinogen intron 7 to carnivores. Molecular Phylogenetics and Evolution 35:483-495.

Zukowsky L (1959). Persische Panther. Der Zoologische Garten 24:329-344.

Genetic and phylogenetic analysis of D-Loop in Persian Leopard

Nassiri M.R.[1, 2], Parizadeh S.A.*[3], Mahdavi M.[3], Ariannejad H.[4]

[1] Associate Professor, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[2] Associate Professor, Institute of biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[3] PhD Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
[4] MSc Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

Persian leopard (*Panthera pardus saxicolor*) is the largest *P. pardus* subspecies in the world. But according to the sharp decline and extinction of populations in some areas, more attention to this subspecies in aspect of genetic conservation is of utmost importance. The goal of this study was to genetic and phylogenetic analysis of D-Loop region in Persian Leopard. Six biological samples of leopard bone and skin were prepared from Tandooreh National Park in Khorasan Razavi province from 2008 to 2011. After DNA extraction, 800bp fragment of the mitochondrial D-Loop was amplified with universal primers, L15926 and H16498 under polymerase chain reaction. Amplified fragments were sequenced with ABI 3130 automated machine under Sanger method. After editing the sequences, the results were compared with sequences from other studies to determine the genetic distances. Variations were not observed in the nucleotide sequences obtained in this study. Using the Neighbor-Joining phylogenetic test results showed that the Persian leopard is in group of *P. pardus* and its haplotype is the same with *saxicolor*.

Keywords: *Persian Leopard, Mitochondrial DNA, D-Loop, Phylogenetic tree, Panthera pardus saxicolor.*

*Corresponding Author: Parizadeh S.A. Tel: 05118796845 Email: amirreza_prz@yahoo.com