

تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه سیتوکروم b در جبیر ایران

محمد رضا نصیری¹، مرتضی مهدوی^{2*}

¹دانشیار، گروه علوم دامی و پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه فردوسی مشهد

²دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: 1390/11/07، تاریخ پذیرش: 1390/11/22

چکیده

جبیر از زیرخانواده بزهای کوهی (*Antilopinae*) و جنس آهو (*Gazella*) می باشد که عمدتاً در نواحی کویر مرکزی و جنوبی ایران زیست می کند. به لحاظ تعیین گونه همواره چالش های زیادی در بین محققین متوجه این حیوان بوده است. هدف از اجرای این مطالعه بررسی ناحیه سیتوکروم b از DNA میتوکندریایی جبیر جهت انجام مطالعات ژنتیکی و فیلوژنتیکی بود. تعداد 5 نمونه بیولوژیک از جبیرهای پناهگاه حیات وحش شیراحمد سبزوار در طول سالهای 86 تا 88 جمع آوری شدند. پس از استخراج DNA از نمونه ها، تکثیر ناحیه سیتوکروم b از DNA میتوکندری به طول 1140 جفت باز به کمک جفت پرایمرهای L14724 و H15915 صورت گرفت. محصولات PCR به کمک دستگاه ABI 3130 به روش سانگر توالی یابی شدند. این توالی ها با 190 توالی موجود از جنس آهو که بر اساس گونه تقسیم بندی شده بودند از لحاظ میزان هم پوشانی و فاصله ژنتیکی به کمک برنامه Bioedit 7 و MEGA5 مقایسه شده و درخت فیلوژنتیک آنها رسم شد. نتایج این تحقیق نشان داد که در بین گونه های مختلف آهو، جبیر کمترین فاصله ژنتیکی، که معادل 0,003 است را با گونه *G. bennetti* دارد، در حالی که بیشترین فاصله ژنتیکی جبیر با *G. dorcas* و یا تاکسون خواهری اش *G. saudiya* می باشد که به ترتیب برابر 0,073 و 0,074 است. این امر می تواند موید تعلق جبیر به گونه *G. bennetti* باشد. **کلیدواژه ها:** جبیر، DNA میتوکندریایی، سیتوکروم b آهوی هندی.

Groves & Harrison, 1967;) یاد شد *G. dorcas* (Corbet, 1978) و در نهایت، در دوره سوم با معرفی چینکارا به صورت یک گونه مستقل (Bohra *et al.*, 1992)، بر اساس شواهد مورفولوژیکی (Groves, 1985) و کاربولوجیکی (Furley *et al.*, 1988) جبیر نیز به عنوان زیر گونه ای از آهوی هندی مورد توجه قرار گرفت. البته باید توجه نمود که هنوز تقسیم‌بندی صحیح، جامع و کاملی از آهوان ایران ارائه نشده است و در حال حاضر در محافل علمی غالباً از جبیر با دو عنوان *Gazella bennetti* و *Gazella dorcas* یاد می‌شود (Ziaie, 2008). با این وجود، طی سال‌های اخیر جبیر در ایران جزو گونه‌های حمایت و حفاظت شده و البته در معرض خطر نابودی قرار گرفته است. با توجه به معین نبودن دقیق گونه آن، جایگاهش در لیست سازمان بین المللی حفاظت از طبیعت و منابع طبیعی (IUCN)¹ هنوز مشخص نیست. از این بابت شناسایی دقیق این گونه در جهت حفاظت از آن بسیار حائز اهمیت است. تا کنون هیچ مطالعه ژنتیکی بر روی جبیر صورت پذیرفته است، این در حالی می‌باشد که در کشورهای دیگر روش‌های مختلفی برای بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف آهو، از بررسی آلوزایم‌ها² گرفته (Vassart *et al.*, 1994) تا استفاده از مارکرهای RFLP، ریز

در کتاب پستانداران ایران (Etemad, 1985) به وجود دو گونه آهو در ایران اشاره شده که یکی آهوی ایرانی یا به عبارتی آهوی گواتر دار (*Gazella Subgutturosa*) و دیگری آهوی جبیر (Jebeer) می‌باشد. این تقسیم‌بندی تا سال 1992 مورد قبول همه کارشناسان بوده است. اما، بعدها نشان داده شد که گونه ای دیگر از آهو به نام آهوی کوهی (*Gazella gazelle*) نیز در ایران زیست می‌کند (Karami, 1993). در حال حاضر از لحاظ رده‌بندی آهوی ایرانی متعلق به گونه *Gazella subgutturosa* و آهوی کوهی متعلق به گونه *Gazella gazelle* تلقی می‌شود (Firouz, 2005). پیشینه شناسایی جبیر در منابع به زمان Blandford (1873) می‌رسد که یک گونه جدید آهو علاوه بر آهوی ایرانی را به نام *Gazella furscifrons* در ایران معرفی نمود. اگر چه بعدها گونه‌های دیگری، از جمله *G. yarkandensis* (Lydekker, 1908) *kennioni* و *G. hayi* (Lydekker, 1911) معرفی شدند. اما، چندی بعد مشخص شد که همه آنها در واقع همان *Gazella furscifrons* می‌باشند (Blaine, 1914). پس از آن رده‌بندی جبیر سه دوره را پشت سر گذرانده است. در دوره اول جبیر، به علت تشابه با آهوی هندی همانند آن به عنوان آهوی کوهی رده‌بندی شد (Ellerman & Morrison-Scott, 1951; Prater, 1971). در دوره دوم از آن به عنوان زیر گونه ای از

¹ International Union for Conservation of Nature

² Allozymes

شده و وجود نواحی حفاظت نشده‌ای مانند ناحیه D-Loop برای مطالعات تکاملی گونه‌های وابسته می‌باشد (Bellagamba *et al.*, 2001). هدف از این مطالعه بررسی و تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه سیتوکروم b از DNA میتوکندریایی جیبر و تعیین جایگاه جیبر در بین گونه‌های مختلف آهو بود.

مواد و روش‌ها

تعداد 5 نمونه بیولوژیکی (پوست و گوشت) از جمعیت جیبرهای پناهگاه حیات وحش شیر احمد شهرستان سبزوار در طول سال‌های 86 تا 88 جمع‌آوری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت Wizard Genomic DNA Purification Kit SV محصول شرکت Promega، با اندکی تغییرات انجام گرفت. قبل از استخراج فرآیند هموژنیزه کردن نمونه‌ها به کمک نیتروژن مایع انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ مدل ND 2000 شرکت THERMO آمریکا مشخص شد. برای تکثیر ناحیه سیتوکروم b به طول 1140 جفت باز از یک جفت پرایمر عمومی² به نام‌های L14724 با توالی 5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGT TG-3' و H15915 با توالی 5'-CCTCAGAAAGATATTTGTCCTC-3' استفاده شد (Kocher *et al.*, 1989; Irwin *et al.*,)

ماهواره‌ها¹ و توالی یابی DNA میتوکندریایی انجام شده است. از جمله می‌توان به توالی یابی ناحیه کنترل میتوکندریایی در گونه *G. granti* (Arctander *et al.*, 1996)، توالی یابی سیتوکروم b در *G. bennetti* و *G. saudiya* (Rebholz & Harley, 1997)، توالی یابی ناحیه کنترل میتوکندریایی و سیتوکروم b در *Tibetan gazelle* (Zhang & Jiang, 2006)، توالی یابی ناحیه کنترل و سیتوکروم b میتوکندریایی *G. saudiya* و *G. dorcas* (Lerp *et al.*, 2011)، استفاده همزمان از توالی یابی سیتوکروم b همراه تکنیک PCR-RFLP در جمعیت *G. saudiya* و *G. dorcas* (Hammond *et al.*, 2001) و جمعیت *G. subgutturosa* (Wacher *et al.*, 2011)، استفاده از مارکر ریز ماهواره‌ها در جمعیت *G. granti* (Huebinger *et al.*, 2006) و *G. dorca* (Beja- Pereira *et al.*, 2004) اشاره نمود. امروزه روش‌های مولکولی، مانند توالی یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم محسوب می‌شود (Bruford *et al.*, 2003). DNA میتوکندریایی (mtDNA) در تشخیص گونه‌ها و ترسیم رابطه فیلوژنتیکی دارای مزایایی، از جمله تعداد کمی بالاتر در هر سلول، اندازه کوچکتر آن، وراثت پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی، وجود نواحی حفاظت

²Universal Primer

¹ Microsatellites

استفاده گردید. از الگوریتم و نرم افزار PHRED (Ewing *et al.*, 1998) به منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی ها استفاده شد. برای ثبت توالی نهایی به دست آمده از نرم افزار Sequin استفاده شد. همچنین به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نمونه مورد مطالعه با دیگر گونه ها، ماتریس فواصل ژنتیکی و نمودار درختی به ترتیب با استفاده از رویه حداکثر درستنمایی ترکیبی¹ و UPGMA به کمک نرم افزار Mega v.5 محاسبه گردید (Tamura *et al.*, 2011). همچنین برای تعیین هاپلوتایپ ها از رویه تحلیل شاخص عدم توافق² در نرم افزار مذکور استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار است. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز 1/5 درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای سیتوکروم b به طول 1140 جفت باز به خوبی تکثیر شده است (شکل 1). نتایج حاصل از توالی یابی قطعه سیتوکروم b برای هر پنج نمونه انجام پذیرفت، اما نتایج حاصل از یکی از نمونه ها به علت کیفیت بسیار پایین کنار گذاشته شد و در آنالیز مورد استفاده قرار نگرفت.

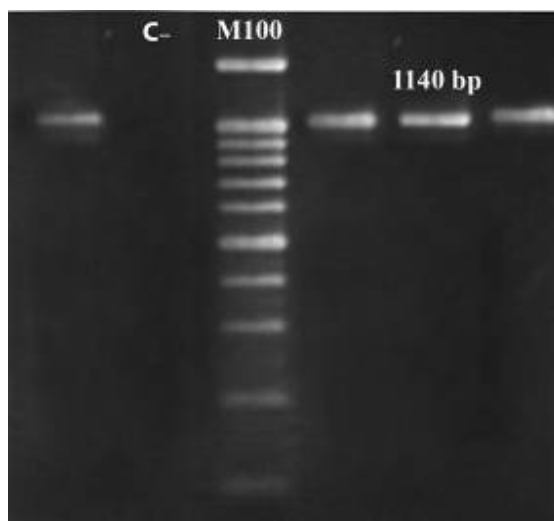
(1991). واکنش زنجیره ای پلی مرز توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal در 35 سیکل و با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت. واسرشت سازی در دمای 94 درجه سانتیگراد برای 30 ثانیه، اتصال در دمای 57 درجه برای 30 ثانیه، تکثیر در دمای 72 درجه برای 45 ثانیه. یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتیگراد برای 5 دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای 72 درجه برای 10 دقیقه نیز انجام شد. حجم واکنش 25 میکرولیتر و اجزای آن شامل 0/6 میکرولیتر DNA، یک واحد آنزیم Taq پلیمرز، 0/5 میکرولیتر dNTPs 10 میلی مولار، 1 میکرولیتر 50 MgCl₂ میلی مولار، 1 میکرولیتر مخلوط پرایمر 5 پیکومولار، 2/5 میکرولیتر بافر 10x و 19 میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. به منظور تایید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش های PCR الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز 1/5 درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید 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 نمونه ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی یابی گردیدند.

از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی ها

¹ Maximum Composite Likelihood

² Disparity Index Analysis



شکل 1- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به طول 1140 جفت باز روی ژل آگاروز 1/5 درصد نشان دهنده کیفیت خوب تکثیر قطعات می باشد.

Figure 2- Electrophoresis of 1140bp PCR products on 1.5% agarose gel, is indicative of good quality for reproduction parts.

صحت توالی یابی معادل 99% را نشان دادند. مقایسه بین چهار توالی با استفاده از ابزار Disparity Index Analysis نرم افزار MEGA 5 وجود سه هاپلوتایپ در جمعیت مورد مطالعه را ثابت نمود (جدول 1). با توجه به این هاپلوتایپ ها می توان توالی مورد توافق را بین این توالی ها محاسبه نمود. از آنجا که توالی مورد توافق بر حسب کد گذاری³ IUPAC برای NCBI تعریف نشده می باشد، از توالی مورد توافق بر اساس معیار اکثریت⁴ استفاده شد. همچنین توالی های مورد مطالعه محتوی 26/3% آدنین، 13/5% سیتوزین، 26/5% گوانوزین و 33/7% تیمیدین بودند.

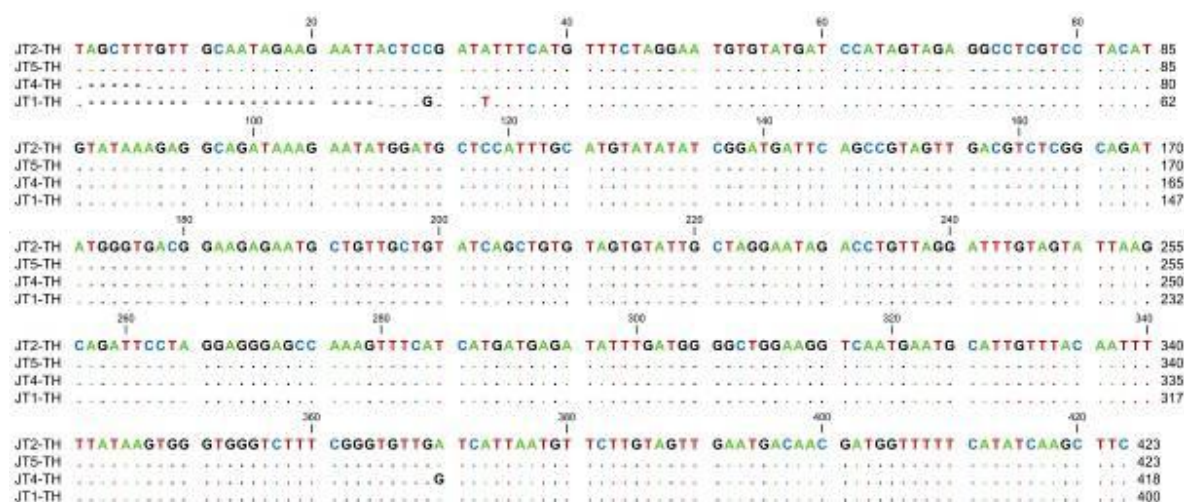
توالی های مربوط به چهار نمونه از لحاظ کیفیت توالی یابی برای هر باز توسط الگوریتم PHRED (Ewing et al., 1998) مورد آنالیز قرار گرفت و کیفیت توالی یابی برای هر باز (q) مشخص شد. در مرحله بعد تعیین توالی مجدد به منظور شناسایی نوکلئوتیدهای مجهول بر اساس احتمال خطای پیش بینی شده¹ انجام پذیرفت و توالی هایی با کیفیت پایین بر اساس انتخاب بلندترین ناحیه² با آستانه میانگین خطای کمتر از 0/1%، از دو انتهای قطعات حذف شدند. در نتیجه توالی هایی با طول حدود 400 تا 423 نوکلئوتید از ناحیه سیتوکروم b برای نمونه ها حاصل شد (شکل 2) که به طور میانگین بیش از 97% نوکلئوتیدها

³ The International Union of Pure and Applied Chemistry

⁴ Majority Index

¹ Estimated Error Probability

² Maximizing region



شکل 2- توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b، به طول 400 تا 423 نوکلئوتید، برای چهار نمونه جیبر.

Figure 2- The nucleotide sequences of cytochrome b for four jebeer samples with length of 400-423b.

جدول 1- هاپلوتایپ های مشاهده شده در جمعیت جیبر.

Table 1- Haplotypes observed in Jebeer population.

جایگاه و نوکلئوتید حفاظت شده			
Locus and conserved nucleotide			
A.370	A 33	C 29	نمونه
			Sample
*	*	*	1
*	*	*	2
G	*	*	3
*	T	G	4

شده اند که دارای همپوشانی بیش از 90% با توالی مورد توافق ناحیه سیتوکروم جیبر هستند. از این بین، یک توالی از ناحیه سیتوکروم آهووی هندی وجود دارد (Rebholz & Harley, 1999) که دارای همپوشانی 100% با توالی جیبر می باشد

در ادامه با استفاده از ابزار BLAST تعیین همولوژی توالی ها با توالی های ارائه شده تا کنون صورت پذیرفت. جستجو در پایگاه نوکلئوتید و فقط در بین اعضای جنس آهو (TaxID:9933) صورت گرفت. حدود 190 توالی در این بخش ثبت

می نماید. برای انجام این محاسبات 190 توالی از تمام گونه های موجود جنس آهو جمع آوری شد و بر اساس گونه گروه بندی شدند (جدول 2). ماتریس فواصل ژنتیکی بین گونه ها بر اساس مقایسه توالی های هر گروه با بقیه گروه ها به صورت دو به دو و با استفاده از مدل حداکثر درستنمایی ترکیبی¹ (Tamura et al. 2004) به دست آمده است. از آنجا که اعداد حاصله نمایانگر میزان جانیشینی نوکلئوتید ها بین توالی های گونه های مورد بررسی می باشند، فاصله ژنتیکی بین دو گونه مرتبط با همبستگی فیلوژنتیکی بین آن گونه ها خواهد بود. در نتیجه از این شاخص می توان برای مشخص کردن دوری یا نزدیکی گونه ها از هم استفاده نمود. همانطور که مشاهده می شود، جیبیر فاصله ژنتیکی معادل با 0/003 با گونه آهوی هندی دارد که نسبت به فاصله اش با دیگر گونه ها از همه کمتر است. از طرفی بیشترین فاصله جیبیر با *G. saudiya* و *G. dorcas* می باشد که به ترتیب برابر 0/073 و 0/074 است. باید توجه داشت که *G. saudiya* و *G. dorcas* همان طور که در این مطالعه مشخص شده قرابت زیادی با هم دارند که مطابق یافته های Hammond et al. (2001) می باشد. آنها این دو گونه را تاکسون های خواهری² می دانند.

($E = 8 \times 10^{-160}$) و همچنین تمامی 11 توالی که دارای 99% هم پوشانی با توالی جیبیر هستند از گونه آهوی هندی می باشند. گونه های آهوی کوهی و آهوی دورکا به ترتیب هر کدام 95-96% و 93-95% هم پوشانی با توالی مورد نظر نشان دادند ($E = 0$). این نتایج دلالت بر قرابت جیبیر به آهوان هندی نسبت به آهوان کوهی و یا آهوان دورکا ارائه می نماید. همانطور که گفته شد بررسی و مطالعات رده بندی انجام گرفته بر روی جیبیر بسیار محدود و اندک بوده و دربرگیرنده تنها دو و یا سه مورد می باشد که در همین منابع موجود نیز نقطه نظر مشترکی در مورد رده بندی این حیوان یافت نمی شود. در منابع موجود گاهی از جیبیر به عنوان زیر گونه ای از آهوی کوهی (Ellerman & Morrison-Scott, 1951) و گاهی به عنوان زیر گونه ای از آهوی دورکا (Groves & Harrison, 1967) و گاهی به عنوان زیر گونه ای از آهوی هندی (Groves, 1993) سخن به میان آمده است. همچنین دایره مطالعات انجام گرفته از بررسی های فنوتیپی فراتر نرفته است و از این لحاظ نتایج حاصله از مطالعه کنونی که بر پایه استفاده از روش توالی یابی میتوکندری می باشد شواهد معتبر تری را در زمینه رده بندی جیبیر ارائه می نماید. محاسبه فواصل ژنتیکی (جدول 3) و ترسیم درخت فیلوژنتیک (شکل 3) برای جیبیر با استفاده از تمامی توالی های سیتوکرومی موجود در پایگاه NCBI نیز تشابه جیبیر به آهوی هندی را تایید

¹ Maximum Composite Likelihood model

² Sister taxon

جدول 2- تعداد گونه مورد استفاده برای رسم درخت فیلوژنتیک جبیر

Table 2- The number of species used to draw phylogenetic tree of Jebeer.

G. dorcas	G. Gazella	G. subgutturosa	G. bennettii	G. leptoceros	G. saudiya	G. subgutturosa marica	G. sp.	G. cuvieri	G. gazella muscatensis	G. spekei	گونه	Species
66	66	19	9	9	9	8	6	5	1	1	تعداد توالی	No. sequence

و مطمئن ترین روش ها برای شناسایی قرابت ژنتیکی در موجودات مختلف می باشد، اما باز هم روش های دقیق تری برای آزمون نتایج وجود دارد. در این مطالعه از توالی ناحیه سیتوکروم میتوکندری برای مقایسه جبیر با دیگر گونه های آهو استفاده شده است. تکثیر ناحیه سیتوکروم b برای شناسایی گونه ها استفاده زیادی دارد (Burgener & Hübner, 1998) و معمولاً همراه با تکنیک RFLP و یا توالی یابی مورد استفاده قرار می گیرد که مورد اخیر دقیق تر می باشد، زیرا به علت وجود ژن های کاذب نتایج حاصل از مطالعات RFLP در این ناحیه گاهی همراه با ابهام خواهند بود (Collura & Stewart, 1995).

به کمک اطلاعات حاصله از جدول 3 درخت فیلوژنتیکی جبیر رسم شد. همانطور که مشاهده می شود، جبیر و آهوی هندی با فاصله صفر در یک گروه قرار می گیرند. *Gazella sp.* یک گونه با منشا نامشخص بوده که توسط Hammond *et al.* (2001) توالی یابی شده و احتمالاً متعلق به گونه آهوی هندی می باشد. از آنجا که *G. s.* به ترتیب زیر *G. g. muscatensis* و *marica* گونه هایی از *G. gazelle* و *G. subgutturosa* می باشند طبق انتظار در یک گروه قرار گرفته اند. در مورد علت قرار گیری *G. saudiya* و *G. dorcas* در یک گروه نیز قبلاً توضیح داده شد. هر چند روش به کار رفته در این مطالعه از دقیق ترین

جدول 3- فواصل ژنتیکی بین گونه های مورد بررسی که با مقایسه توالی های گونه های مختلف با هم بدست آمده است. هر عدد در ردیف و ستون اول نشان دهنده یک گونه می باشد که در زیر جدول توضیح آن آمده است. اعداد داخل پرانتز در ستون اول نشان دهنده میانگین فاصله ژنتیکی در داخل هر گونه می باشد. برای گونه هایی که فقط یک گزارش از توالی آنها وجود داشته این شاخص محاسبه نشده است (n/a).

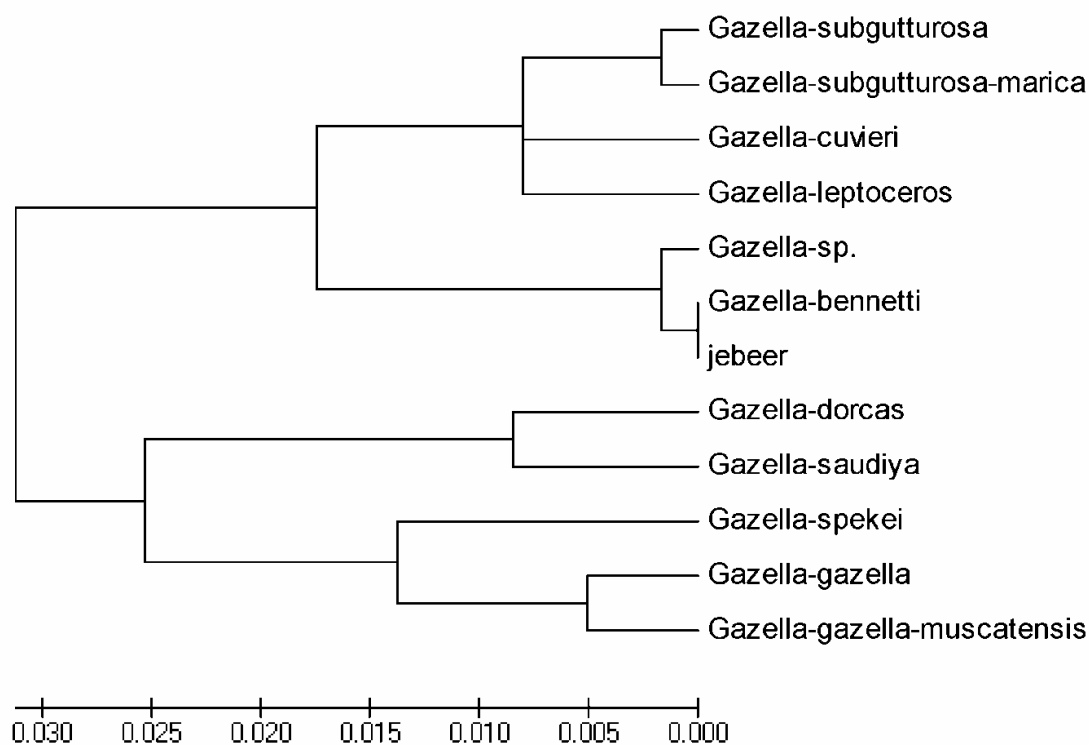
Figure 3- Estimates of evolutionary divergence over sequence pairs between groups. Each number in first row and column indicates a species, that it has been explained at end of table. The number in parentheses in the first column shows the average genetic distance within each species. The presence of n/c in the results denotes cases in which it was not possible to estimate evolutionary distances. 1=G. dorcas, 2=G. leptoceros, 3=G. gazelle, 4=G. saudiya, 5=G. s. marica, 6=G. g. muscatensis, 7=G. bennetti, 8=G. sp., 9=G. subgutturosa, 10=G. cuvieri, 11=G. spekei, 12=Jebeer.

گونه ها Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 (0.0016)												
2 (0.0194)	0.065											
3 (0.0004)	0.027	0.036										
4 (0.0231)	0.036	0.066	0.032									
5 (0.0000)	0.071	0.015	0.042	0.070								
6 (n/c)	0.027	0.035	0.000	0.032	0.042							
7 (0.0060)	0.075	0.030	0.058	0.075	0.014	0.058						
8 (0.0316)	0.079	0.038	0.058	0.077	0.023	0.058	0.022					
9 (0.0305)	0.087	0.047	0.058	0.082	0.035	0.058	0.050	0.039				
10 (0.0054)	0.068	0.014	0.039	0.068	0.003	0.039	0.017	0.026	0.038			
11 (n/c)	0.027	0.035	0.000	0.032	0.042	0.000	0.058	0.058	0.058	0.039		
12 (0.0000)	0.073	0.030	0.058	0.074	0.014	0.058	0.003	0.020	0.050	0.017	0.058	

Omland, 2003) که باید مورد توجه قرار گیرد. امروزه برای شناسایی گونه ها روشی تحت عنوان بارکدگذاری DNA¹ در حال گسترش می باشد (Hebert et al., 2003). بارکدگذاری DNA سیستمی نوین را برای شناخت و شناسایی گونه ها با استفاده از بخش کوچکی از DNA، به عنوان بخش استاندارد ژنوم تعریف می کند (Kress et al., 2005).

البته این ناحیه یک ناحیه کد کننده می باشد و از این لحاظ میزان جهش و تنوع در آن پایین است. در نتیجه مطالعه روی نواحی با تنوع بالاتر مانند ناحیه D-Loop و Control Region می تواند نتایج مطمئن تری را تولید نماید. این نواحی به دلیل بالا بودن میانگین جهش و ابقای جهش های رخ داده دارای تنوع بالایی در بین گونه ها می باشند (Eyre-walker & Awadalla, 2001). همچنین DNA میتوکندریایی دارای محدودیت های خاصی می باشد (Funk &

¹DNA Barcoding



شکل 3- درخت فیلوژنتیک جبیر، قرابت آن را با گونه آهوی هندی تایید می کند.

Figure 3- Phylogenetic tree of Jebeer confirmed high similarity between Jebeer and chinkara.

جبیر که در این مطالعه به کمک پرایمرهای عمومی H15915 و L14724 صورت گرفت کار بسیار دشواری است و مکرراً منجر به شکست می شود. چنین مشکلی برای دیگر محققین مانند Lerp *et al.* (2011) نیز وجود داشته است. در نتیجه توصیه می شود که به جای تکثیر کل این ناحیه، از دو پرایمر L14724 و H15149 (Hundertmark, 2005) استفاده شود که منجر به تکثیر حدود 425 نوکلئوتید از این ناحیه می شود و شانس موفقیت بالاتری دارد. در نهایت باید به این نکته توجه نمود که نتایج این مطالعه هر چند دلالت

ناحیه ژنی که برای شناسایی مورد استفاده قرار می گیرد ناحیه 648 نوکلئوتیدی در ژن سیتو کروم اکسیداز (COI) میتوکندری می باشد، که علی رغم کوتاهی، تعیین توالی سریع و ارزان آن، اطلاعات کافی را برای شناسایی و جدایی گونه های نزدیک فراهم می آورد. البته هر چند امروزه این روش برای شناسایی گونه های ناشناخته و یا تغییر در رده بندی موجودات مورد استفاده قرار گرفته (Koch, 2010)، اما ابهاماتی در مورد دقت آن در این زمینه وجود دارد (Seberg & Petersen, 2009). همچنین تکثیر کل ناحیه سیتوکروم b،

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 می دارند.

بر نزدیکی زیاد بین جبیر و گونه آهوی هندی و از طرفی فاصله ژنتیکی بالای آن با *Gazella dorcas* دارد، اما باز هم نمی تواند به طور یقین نمایانگر تعلق جبیر به گونه آهوی هندی باشد. تعداد نمونه پایین و کوتاه بودن طول قطعه مورد بررسی و همچنین عدم استفاده از چند جایگاه می تواند محدودیت هایی باشد که با مرتفع نمودن آنها در مطالعات بعدی می توان با یقین بیشتری در این مورد سخن گفت.

منابع

- Arctander P, Kat PW, Aman RA, Siegismund HR (1996). Extreme genetic differences among populations of *Gazella granti*, Grant's gazelle, in Kenya. *Heredity* 76: 465-475.
- Beja-Pereira A, Zeyl E, Ouragh L, Nagash H, Ferrand N, Taberlet P, Luikart G (2004). Twenty polymorphic microsatellites in two of North Africa's most threatened ungulates: *Gazella dorcas* and *Ammotragus lervia* (Bovidae; Artiodactyla). *Molecular Ecology Notes* 4: 452-455.
- 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: 3775-3781.
- Blaine G (1914). *Catalogue of the ungulate mammals in the British Museum: vol 3*. British Museum (Natural History), London.
- Blanford WT (1873). Note on the gazelles of India and Persia, with description of a new species. *Proceedings of the Zoological Society of London*, London, pp. 313-319.
- Bohra HC, P. GS, Ghosh PK, Prakash I (1992). Studies on ethology and ecophysiology of Antelopes of the Indian Desert. *Annals of Arid Zone* 31: 83-96.
- Bruford M, Bradley D, Luikart G (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 3: 900-910.
- Burgener M, Hübner P (1998). Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis. *Z Lebensm Unters Forsch A* 207: 261-263.
- Collura RV, Stewart CB (1995). Insertions and duplications of mtDNA in the nuclear genomes of Old World monkeys and hominoids. *Nature* 378: 485-489.
- Corbet GB (1978). *The mammals of the palaeartic region: A taxonomic review*. British Museum (Natural History) and Cornell University Press, London and Ithaca.
- Ellerman JR, Morrison-Scott TCS (1951). *Checklist of Palaeartic and Indian mammals, 1758 - 1947*, 2 edn. British Museum (Natural History), London.
- Etemad I (1985). *Mamals of Iran, vol 2*. Iran wildlife center (In Farsi).

- 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.
- Furley CW, Tichy H, Verpmann HP (1988). Systematics and chromosomes of the Indian gazelle, *Gazella bennetti* (Sykes, 1831). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 53: 48-54.
- Groves CP (1985). An introduction to the gazelles. *Chinkara* 1: 4-16.
- Groves CP (1993). The chinkara (*Gazella Bennettii*) in Iran, With The Description Of Two New Subspecies. *Journal of science of I. R. Iran* 4: 166-178.
- Groves CP, Harrison DL (1967). the taxonomy of the gazelles (genus *Gazella*) of Arabia. *Journal of Zoology* 152: 381-387.
- Hammond RL, Macasero W, Flores B, Mohammed OB, Wacher T, Bruford MW (2001). Phylogenetic reanalysis of the saudi gazelle and its implications for conservation. *Conservation Biology* 15: 1123-1133.
- Hebert PDN, Cywinska A, deWaard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 270: 313- 321.
- Huebinger RM, Maar TWJD, Woodruff LH, Pomp D, Louis Jr EE (2006). Characterization of eight microsatellite loci in Grant's gazelle (*Gazella granti*). *Molecular Ecology Notes* 6: 1150-1151.
- Hundertmark KJ (2005). Research Summary at KKWRC. Thumamah, Saudi Arabia: King Khalid Wildlife Research Centre, Unpublished.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32: 128-144.
- Karami M (1993). Multivariate analysis and descriptive statistics of Persian gazelle skull from faroor island of Iran. *Iranian Journal of Natural Resources* 46: 95 (In Farsi).
- Koch H (2010). Combining morphology and DNA barcoding resolves the taxonomy of Western Malagasy *Liotrigona* Moure. *African Invertebrates* 51: 413-421.
- 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.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 8369-8374.
- Lerp H, Wronski T, Pfenninger M, Plath M (2011). A phylog eographic framework for the conservation of Sahara n and Arabian Dorcas gazelles (*Artiodactyla: Bovidae*). *Organisms Diversity & Evolution* 11: 317 -329.
- Lydekker R (1908). The gazelles of Seistan. *The Field* 111:499.
- Lydekker R (1911). An African rhinoceros, klipspringer, and gazelle. *Proceedings of the Zoological Society of London* 111: 958-962.
- Prater SH (1971). *The book of Indian animals*. Bombay Natural History Society, Bombay.

- Rebholz WER, Harley EH (1997). Cytochrome b Sequences from the Endangered Saudi Gazelle (*Gazella Saudiya*) Suggest Hybridization with Chinkara (*G. bennetti*). *Conservation Biology* 11: 251-255.
- Rebholz W, Harley E (1999). Phylogenetic relationships in the bovid subfamily Antilopinae based on mitochondrial DNA sequences. *Journal of Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 87-94.
- Seberg O, Petersen G (2009). How many loci does it take to dna barcode a crocus? *PLoS One* 4: e4598.
- Tamura K, Nei M, Kumar S (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101: 11030-11035.
- 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.
- Vassart M, Granjon L, Greth A, Catzeflis FM (1994). Genetic relationships of some *Gazella* species: an allozyme survey. *Zeitschrift fur saugetierkunde* 59: 236-245.
- Wacher T, Wronski T, Hammond RL, Winney B, Blacket MJ, Hundertmark KJ, Mohammed OB, Ome SA, Macasero W, Lerp H, Plath M, Bleidorn C (2011). Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA sequences reveals polyphyly in the Goitred gazelle (*Gazella subgutturosa*). *Conservation Genetics* 12: 827-831.
- Ziaie H (2008). A field guide to the mammals of Iran, 2 edn. Iran wildlife center.

Genetic and phylogenetic analysis of cytochrome b region in Jebeer of Iran

Nassiri M.R.¹, Mahdavi M.^{*2}

¹Associate Professor, Animal Science Department and Institute of biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad

²PhD Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

Jebeer is belonging to subfamily of mountain goats (*Antilopinae*), genus of Gazelle (*Gazella*) and found mainly in central and southern desert areas of Iran. There are many challenges between researchers about determining Jebeer species. Whereas determining Jebeer species is first step in protecting of them we perform this research. In this regard 5 biological samples from Shirahmad's wild life refuge of Sabzevar were collected and cytochrome b region of mitochondrial DNA have been amplified with L14724 and H15915 primers. Resulting fragments were sequenced with ABI 3130 automated device with Sanger method. These sequences compared with 190 sequences from *Gazella* genus that classified according to species with regard to homology and genetic distances, then phylogenetic tree have been drawn. Results show that among all *Gazella* sp. Jebeer have least distance equal to 0.003 with *G. bennetti* and most distance with *G. dorca* and his sister taxon *G. saudiya* that is equal to 0.073 and 0.074 respectively. Thereby can conclude that Jebeer is belonging to *G. bennetti* species not *G. dorcas*.
Keywords: *Jebeer*, *Cytochrome b*, *Mitochondrial DNA*, *Gazella bennetti*.

* Corresponding Author: Mahdavi M. Tel: 09159115738

Email: Fum.authors@gmail.com