بررسی و تحلیل فیلوژنتیکی ناحیه COXI در برخی از نژادهای بز ایرانی

- **رضا سیدشریفی***: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
- **نجات بادبرین**: مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹٦ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷

چکیده

DNA میتوکندریایی یکی از گسترده‌ترین نشانگرهای مولکولی برای مطالعات فیلوژنتیک در حیوانات به‌علت ساختار ژنوم ساده آن است. این مطالعه ویژگی‌های ژنتیکی بزهای بومی را با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی DNA Cytocrome oxidase I (COXI) برای شناسایی و تمایز بین سه نژاد (نجدی، عدنی و مرخز) ایران بررسی می‌کند. استخراج DNA با استفاده از روش بهینه شده نمکی انجام شد و ژن سیتوکروم اکسیداز I به‌روش PCR با یک جفت پرایمر، تکثیر گردید. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Mega٦ به‌دست آمد. توالی COXI از ٦٠ بز دارای تنوع هاپلوتیپی ۰/٤۷ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۵ بود. تجزیه و تحلیل‌ها به‌کمک رویه Composition برنامه Edit Bio نشان داد این توالی برای ناحیه COXI شامل ۲۸/۹۷ درصد نوکلئوتید A، ۲۵/۵۲ درصد نوکلئوتید C، ۱۵/۸٦ درصد نوکلئوتید G و ۲۹/٦٦ درصد نوکلئوتید T می‌باشد که نسبت C+G، ٤۲ درصد و A+T، ۵۸ درصد است. ارتباط تکاملی به‌وسیله درخت فیلوژنتیک نمایش داده شد. درخت فیلوژنی نشان داد که بزهای ایرانی در یک شاخه جداگانه خوشه‌بندی شده است. این نتیجه به‌طور گسترده از توزیع جغرافیایی این نژادها در ایران پیروی می‌کند و می تواند در طراحی برنامه‌های حفاظت و مدیریت نژادهای بز ایرانی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: COXI ، تنوع ژنتیکی، آنالیز فیلو ژنتیکی، بز ایران

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: reza_seyedsharifi@yahoo.com

مقدمه

در ایران حدود ۲۱ توده و نژاد بزشناسایی و پرورش داده می‌شود که از نظر ویژگی‌های تولیدی و ظاهری با یکدیگر متفاوت هستند. نژادهای بز ایران بیش‌تر به‌منظور تولید گوشت پرورش داده می‌شوند ولی کرک و مو نیز برای مصرف در صنایع دستی و صادرات اهمیت ویژه‌ای دارد. نژادهای بومی هر کشور به‌عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک آن کشور محسوب می‌شوند و حفظ و تکثیر آن‌ها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. با نگاهی به گذشته به‌خوبی می‌توان دریافت که بز بومی شایستگی خود را به‌خوبی ثابت‌نموده و نشان داده است که نقش بسیار مهم و اساسی در تولید پروتئین و شیر حیوانی به‌ویژه در روستاها دارد. ازجمله دلایل توجه به بزهای بومی کشور، قدرت‌سازگاری‌ومقاومت بیش‌تر در مقابل شرایط محیطی و بیماری‌ها، نیاز کم‌تر به هزینه نگه‌داری، امکانات و تکنولوژی پرورشی، ایجاد اشتغال و کمک به کاهش روند مهاجرت از روستا به شهر، افزایش درآمد خانوار روستایی و تأمین پروتئین مورد نیاز آنان و غیره می‌باشد (توکلیان، ۱۳۷۸). ژنوم میتوکندری در بیش‌تر جانوران منشأ مادری دارد و توارث اکثراً به‌صورت تک‌والدی می‌باشد، البته در برخی جانوران مانند درزوفیلا و موش منشأ پدری هم گزارش شده است (Bruford و همکاران، ۲۰۰۳). هنگام لقاح، تمام میتوکندری تخمک از طریق اووسیت وارد سلول تخم می‌شود و پروتئین‌های درون اووسیت، میتوکندری اسپرم را از بین می‌برند، در نتیجه توارث میتوکندری به‌صورت مادری می‌باشد (Davidzon و Dimauro، ۲۰۰۵). بنابراین اگر مادر دارای جهش در ژنوم میتوکندری‌های خود باشد آن را به تمام فرزندانش (اعم از دختر و پسر) انتقال می‌دهد، اما تنها دخترانش آن را به فرزندانشان منتقل می‌کنند (Graff، ۱۹۹۹). ژنوم میتوکندری دارای دو رشته L (زنجیره سبک) و H (زنجیره سنگین) است. رشته L غنی از پیریمیدین (C+T) و رشته H غنی از پورین (A+G) است. ۹ ژن توسط رشته سبک و ۲۸ ژن توسط رشته سنگین حمل می‌شوند (هوشمند، ۱۳۸۴). اطلاعات ژنتیکی ژنوم میتوکندری برای سنتز تمام پروتئین‌ها و آنزیم‌های موجود در این اندامک کافی نیست. در گونه‌های جانوری ژنوم میتوکندریایی ۳۷ ژن را کد می‌کند که شامل ۱۳ ژن کدکننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کدکننده tRNA و ۲ ژن کدکننده rRNA می‌باشد. کدکردن tRNA و rRNA بیانگر سنتز پروتئین در میتوکندری است (هوشمند، ۱۳۸۴). در بین نشانگرهای ژنتیکی توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای تشخیص تنوع ژنتیکی و تعیین رابطه فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به‌هم می‌باشد (Hiendleder و همکاران، ۱۹۹۸). مقایسه توالی‌های مناطق مختلف ژنوم میتوکندری به‌دلیل سرعت بالای تکامل ژنوم میتوکندری در مقایسه با ژنوم هسته شواهدی را در مورد تنوع ژنتیکی و منشا تکاملی گونه‌ها فراهم می‌کند (لولایی، ۱۳۷۹). سیتوکروم اکسیداز C یک پروتئین غشایی بزرگ است که در باکتری‌ها نیز یافت می‌شود. آنزیم سیتوکروم c اکسیداز آنزیمی است که به‌طور عموم در کلیه موجودات زنده وجود دارد. اختلافات موجود در ناحیه ژن COXI و COXII میتوکندریایی بین گونه‌های جانوری به شکلی است که از آن می‌توان به‌عنوان یک شناساگر ژنتیکی برای تشخیص هویت بیولوژیکی، تشخیص تنوع ژنتیکی و تعیین روابط فیلوژنتیکی بین جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به‌هم استفاده نمود (Zhang و همکاران، ۲۰۰۶). عباسی‌دلویی و همکاران (۱۳۹۵)، چندشکلی ژن COXIII را در جمعیت شترهای تک و دوکوهانه ایرانی با استفاده از روش تعیین توالی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در تحقیق خود مشاهده کردند هیچ تفاوت تک نوکلئوتیدی بین شترهای تک و دو کوهانه برای این ناحیه وجود ندارد. آلبوشکه و همکاران (۱۳۹۳)، چندشکلی ژن COXI را در جمعیت مرغ بومی خراسان با استفاده از روش تعیین توالی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در تحقیق خود ۶ ناحیه چندشکل را در جمعیت مورد مطالعه گزارش کردند. با این‌حال فقط سه جهش منجر به تولید اسیدهای آمینه غیرهمسان گردید. Liu و همکاران (۲۰۰۶)، برای تعیین منشأ و تنوع‌ژنتیکی بزهای چینی، توالی D-Loop میتوکندریایی ۱۸۳ بز از ۱۳ نژاد را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که دامنه تنوع‌هاپلوتیپی در بین نژادها از ۰/۹۳۳۳ تا ۱ و تنوع‌نوکلئوتیدی بین ۰/۰۰۶۳۳۷ تا ۰/۰۲۵۱۹۱ می‌باشد. هم‌چنین جمعیت‌های مورد مطالعه در ۴ هاپلوگروه قرار گرفتند که فراوانی هاپلوگروه A بیش‌ترین، هاپلوگروه B متوسط و هاپلوگروه‌های C و D کم‌ترین گزارش گردید. هدف از این پژوهش تعیین ساختار ژنتیکی و رابطه فیلوژنتیکی بزهای بومی (نجدی، مرخز و عدنی) ایران در ژنوم میتوکندریایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از تعداد ۶۰ رأس بزهای نژاد مرخز، نجدی و عدنی به‌ترتیب از استان‌های کردستان، خوزستان و بوشهر نمونه‌گیری صورت گرفت. نمونه‌های خون به‌مقدار ۵ میلی‌لیتر از سیاهرگ وداج گردنی، در تیوب‌های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA اخذ و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال و تا زمان استخراج DNA در فریزر ^{oc}۲۰- نگه‌داری شدند. از آن‌جا که غلظت DNA استخراج شده در نمونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد، پس از بررسی تمامی نمونه‌ها آن‌ها را به ۵ گروه از نظر غلظت تقسیم کرده و رقیق کردن آن‌ها به کمک بافر TE به‌نحوی انجام شد که DNA رقیق شده در هر میکرولیتر حاوی حدود ۵۰ نانوگرم DNA باشد که غلظت آن توسط نانودراپ مورد تأیید قرار گرفت. در این

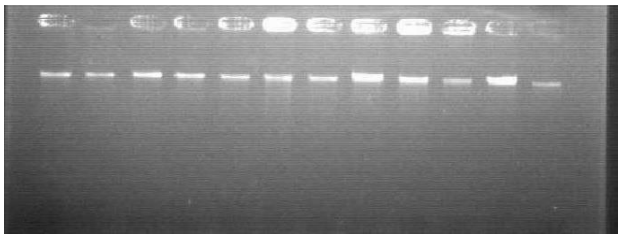
تحقیق از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده براساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه COXI ژنوم میتوکندری بز استفاده شد. از نرم‌افزار Primer Premier برای طراحی پرایمرها جهت تکثیر نواحی COXI ژنوم میتوکندریایی به‌طول ۱۲۸۶ جفت باز استفاده گردید. توالی پرایمرها به‌شرح زیر بود:

F 5′-GACATCGGCACCCTCTAC-3′
R 5′-TCAGAGTATCGTCGTGGT-3′

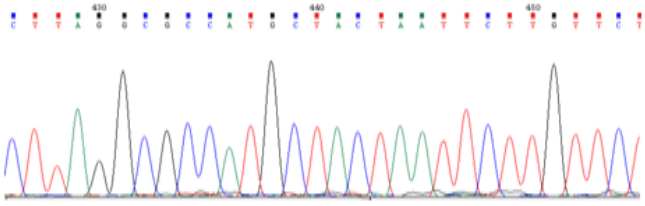
۲۰ میکرولیتر (۴۰۰ نانوگرم) از محصولات PCR خالص‌سازی شده به همراه ۲۰ میکرولیتر (۳۰ پیکومول) از هریک از رشته‌های آغازگر رفت یا برگشت مورد استفاده در PCR به‌ازای هر نمونه در تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به‌طور جداگانه برای هر نمونه جهت توالی‌یابی به کره جنوبی فرستاده شد و با سرویس Value Read به‌طور اتوماتیک توالی‌یابی شد. جهت توالی‌یابی در دو رشته سمت ´۵ به ´۳ توسط پرایمر مستقیم از رشته پیش‌رو و توسط پرایمر معکوس از رشته پیرو است. به‌همین دلیل توالی‌های حاصل از پرایمر معکوس باید مکمل‌سازی شوند تا هر دو رشته به درستی زیر هم چیده شوند. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از برنامه Chromas Lite تجزیه و تحلیل شد. جهت تعیین بالاترین همولوژی توالی بز از رویه Blast تحت پایگاه NCBI استفاده گردید. مقایسه توالی‌ها و هم‌ردیف کردن آن‌ها با استفاده از رویه ClastalW صورت گرفت. توالی Consensus برای بز با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Bio edit تعیین شد و این توالی توسط برنامه Sequin پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید. جهت رسم نمودار فیلوژنی از رویه Neighbor- joining نرم‌افزار MEGA۶ استفاده شد و برای مقایسات فیلوژنی توالی ناحیه COXI، یک فیلوژنی با توالی بزهای مرخز، نجدی وعدنی با سایر نژادها درجهان برای تعیین گروه هاپلوتیپی رسم گردید.

نتایج

الکتروفورز تمام نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد نشان‌دهنده باندهای کاملاً شفاف و روشن، فاقد شکستگی و بدون کشیدگی در اثر آلودگی با نمک یا RNA بودند. هم‌چنین شفاف و متراکم بودن باندها بیانگر غلظت بالای DNA می‌باشد که این امر نشان‌دهنده موفقیت این روش در استخراج DNA از خون کامل در نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد (شکل ۱). توالی‌یابی به‌روش کاملاً اتوماتیک انجام گرفت. در کل ۶۰ نمونه توالی‌یابی گردید. کیفیت توالی‌یابی مناسب و موارد خوانش نشده به‌جز در ابتدای توالی که محل اتصال پرایمر است و معمولاً به‌دلیل اتصال پرایمر خوانش نمی‌شود وجود نداشت. با استفاده از نرم‌افزار Chromas Lite توالی‌های خوانش شده با فرمت ABI به‌صوت منحنی و قله‌های رنگی قابل مشاهده درآمدند. سپس با تغییر میزان کشیدگی قله‌های رنگی صحت خوانش نوکلئوتیدها در تمام توالی‌ها بررسی شد. بررسی‌ها نشان داد قسمت ابتدای توالی به‌خوبی مورد خوانش قرار نگرفته بود که محل اتصال پرایمر است. این امر معمولاً در توالی‌یابی محصولات PCR که کلون نشده‌اند دیده می‌شود. توالی‌یابی در سایر نقاط با کیفیت بسیار مناسبی صورت گرفته بود. به‌طورکلی کیفیت توالی‌یابی مناسب بود که ناشی از خالص سازی قطعات تکثیری قبل از ارسال نمونه‌ها می‌باشد (شکل ۲).



شکل۱: DNA استخراج شده روی ژل آگارز

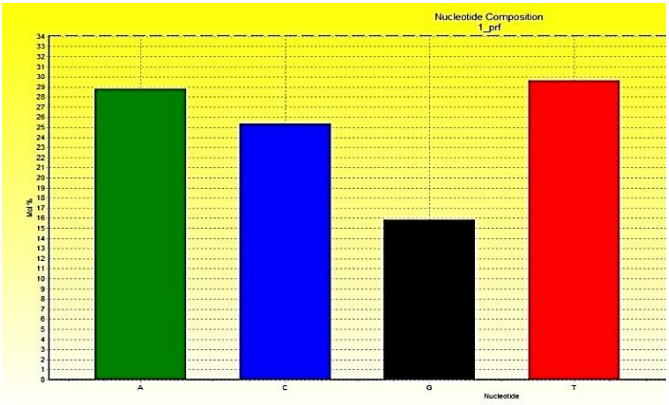


شکل۲: بررسی صحت توالی‌یابی نمونه‌ها

قبل از انجام آنالیزهای دیگر بر روی نمونه‌ها لازم است، نمونه‌ها هم‌ردیف شوند. به‌همین منظور توالی همه نمونه‌ها توسط رویه ClustalW نرم‌افزار Bio Edit هم‌ردیف شدند. نتایج نشان داد هم‌ردیف شدن قطعات مورد آنالیز به‌خوبی صورت گرفته است و نمونه‌ها در سطح ۱۰۰ درصد با یکدیگر هم‌پوشانی داشتند. به این منظور نمونه‌های هم‌ردیف شده جهت تعیین توالی Consensus با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit و با طول تقریباً ۱۲۸۶ جفت باز برای ژن COXI به‌دست آمد (شکل ۳).

شکل ۳: توالی Consensus شده برای ناحیه COXI

ترکیب نوکلئوتیدی توالی Consensus: آنالیزها به‌کمک رویه Composition برنامه Bio Edit نشان داد این توالی برای ناحیه COXI شامل ۲۸/۹۷ درصد نوکلئوتید A، ۲۵/۵۲ درصد نوکلئوتید C، ۱۵/۸۶ درصد نوکلئوتید G و ۲۹/۶۶ درصد نوکلئوتید T می‌باشد (شکل۴) که نسبت C+G، ۴۲ درصد و A+T، ۵۸ درصد است.



شکل۴: درصد ترکیب نوکلئوتیدی توالی Consensus برای ناحیه COXI

بحث

آنالیزها نشان داد این توالی برای ناحیه COXI شامل ۲۸/۹۷ درصدنوکلئوتید A، ۲۵/۵۲درصدنوکلئوتید C، ۱۵/۸۶ درصد نوکلئوتید G و ۲۹/۶۶ درصد نوکلئوتید T می‌باشد(شکل۴) که نسبت C+G، ۴۲ درصد و A+T، ۵۸ درصد است. این یافته با اکثر نتایج تحقیقاتی که درصد A+T را نسبت به درصد G+C در ناحیه COXI، بیش‌تر گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد (Hiendleder و همکاران، ۱۹۹۸). Hiendleder وهمکاران(۲۰۰۲) در بررسی کامل ناحیه ژنوم میتوکندری گوسفندان وحشی و بومی، مشابه با تحقیق حاضر هیچ حذف و اضافه نوکلئوتیدی در ناحیه COXI مشاهده نکردند و همه آن‌ها از نوع جایگزینی بودند.

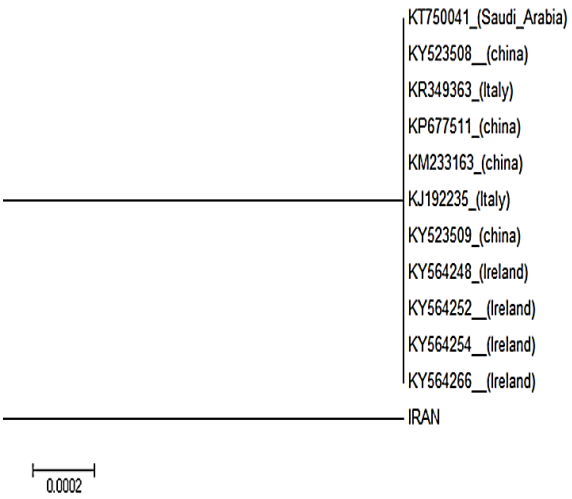
تنوع‌ژنتیکی COXI: مقادیر تنوع هاپلوتیپی (Hd) و تنوع نوکلئوتیدی(π) در جمعیت بزهای ایرانی (Hd =۰/۴۷، π =۰/۰۰۰۵) گزارش شد. تنوع نوکلئوتیدها و تنوع هاپلوتیپ در منطقه mtDNA COXIشاخص‌های مهم برای ارزیابی چندشکلی جمعیت و تمایز ژنتیکی هستند. مقادیر برآورد شده بسیار پایین‌تر از منطقه D-loop بود که نشان می‌دهد که ژن COXI نسبتا محافظت شده است. Javanrouh و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی DNAهای هسته‌ای با استفاده از نشانگر RAPD، برای شش جمعیت بومی بز نشان دادند که محتوای اطلاعات چندشکلی ۶ نژاد پایین می‌باشد. هم‌چنین عباسی‌دلویی و همکاران (۱۳۹۵) و آلبوشکه و همکاران (۱۳۹۳)، چندشکلی ژن سیتوکروم اکسیداز را در جمعیت شترهای ایرانی و جمعیت مرغ بومی خراسان مورد بررسی قرار دادند که مطابق با تحقیق حاضر، تنوع نوکلئوتیدی پائینی را گزارش کردند که بیانگر محافظت‌شدگی ناحیه مذکور می‌باشد. در تأیید با موضوع حفاظت‌شدگی ناحیه کدشونده میتوکندری می‌توان مشاهده نمود که در مطالعات انجام‌شده بیش‌ترین تنوع‌ژنتیکی در توالی ناحیه غیرکدشونده گزارش شده و در ناحیه کدشونده با توجه به طول بیش‌تر جفت بازهای این ناحیه در مقایسه با ناحیه غیرکدشونده، تنوع ژنتیکی نسبی بسیار کم‌تری مشاهده می‌شود.

Seyedabadi و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی ناحیه غیرکدشونده در جمعیت بز مرخز، ۲۰ ناحیه چندشکل را مشاهده کردند. نتایج این مقایسه‌ها وجود اختلاف شدید را در این ناحیه از ژنوم میتوکندری، مابین آن‌ها نشان می‌دهد.

مقایسه توالی به‌دست آمده با توالی‌های موجود در NCBI: ارتباط تکاملی بین موجودات به‌وسیله درخت فیلوژنتیک نمایش داده می‌شود. از آن‌جاکه تکامل در طول دوره‌های زمانی طولانی که به‌طور مستقیم قابل مشاهده نیست اتفاق می‌افتد، زیست‌شناسان باید فیلوژنی‌ها را با استنباط روابط تکاملی میان جانداران امروزی بازسازی کنند (Bradley و همکاران، ۱۹۹۶). امروزه، داده‌های مولکولی، شامل پروتئین و رشته‌های DNA، برای تشخیص روابط تبارزایی و ساخت درخت‌های فیلوژنتیک استفاده می‌شوند.

در این مطالعه از توالی نواحی COXI ژنوم میتوکندریایی بزهای نجدی، عدنی و مرخز برای بررسی روابط فیلوژنتیکی استفاده شد. به این صورت که در مرحله اول، توالی مورد توافق این نواحی با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI تحت فرآیند BLAST مورد مقایسه قرار گرفت. طی این فرآیند تعدادی توالی نواحی COXI ژنوم میتوکندریایی بز از کشورهای مختلف که با نواحی مورد مطالعه هم‌پوشانی داشتند، از این پایگاه دریافت و تحت‌رویه Clustal برنامه MEGA۶ با توالی‌های به‌دست آمده در این مطالعه هم‌ردیف‌سازی شد. درخت فیلوژنتیک توالی بز بومی ایران با استفاده از رویه Neighbor-joining با توالی‌های بز گزارش شده از ایتالیا (KJ192235, KR349363)، چین (KP677511, KY523508 , KY523509, KM233163) عربستان سعودی (KT750041) و ایرلند (KY564254,KY564266, KY564248 KY564252) ایجاد شد (شکل ۵).

درخت فیلوژنی نوکلئوتید ژن COXI نشان داد که بزهای ایرانی در یک شاخه جداگانه خوشه‌بندی شده است. دلیل این فاصله احتمالا ناشی از فاصلهٔ جغرافیایی زیاد بین محل پراکنش بزهای مورد مطالعه با سایر نژادهای بز و وجود موانع جغرافیایی عمده مانند کوهستان و محدودیت تبادل ژنتیکی طبیعی این جمعیت‌ها با سایر جمعیت‌ها و هم‌چنین تفاوت‌های فنوتیپی آشکار آن با سایر نژادها می‌باشد.



شکل۵: مقایسه توالی Consensus به‌دست آمده برای ناحیه COXI با توالی‌های موجود در NCBI

این مطالعه اولین مورد از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک COXI نژاد بزهای ایرانی می‌باشد. ساختار COXI در طی تکامل نژادهای بز، حفاظت‌شده باقی مانده است. نتایج حاصل از رسم درخت NJ براساس توالی نوکلئوتیدی ژن COXI نشان داد که بزهای ایرانی در یک رده جداگانه خوشه‌بندی می‌شوند. این نتیجه به‌طور گسترده‌ای از توزیع جغرافیایی آن‌ها درایران پیروی می‌کنندومی‌تواندطراحی برنامه‌های حفاظت و مدیریت نژادهای بز ایرانی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به این‌که جهش‌های شناسایی شده در این ناحیه در بین سه جمعیت مورد مطالعه مشابه بودند، امکان محاسبه فاصله نسلی و تشخیص نژادهای در معرض خطر انقراض وجود نداشت.

منابع

۱. **آلبوشوکه، س.ن.؛ طهمورث‌پور، م. و نصیری، م.ر.، ۱۳۹۵.** شناسایی و توالی‌یابی ژن MT-COX1 در مرغ بومی خراسان. ژنتیک در هزاره سوم. جلد ۱۲، شماره ۲، صفحات ۳۵۲۰ تا ۳۵۲۷.

۲. **توکلیان، ج.، ۱۳۷۸.** نگرشی بر ذخایر ژنتیکی دام و طیور بومی ایران. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور. صفحه ۴۵۱.

۳. **عباسی‌دلویی، ط.؛ سخاوتی، م.ه. و طهمورث‌پور م.، ۱۳۹۴.** تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی ژن COX ۳ میتوکندری شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه ایران. پژوهش‌های علوم دامی ایران. جلد ۸. شماره ۲. صفحات ۳۶۹-۳۶۱.

۴. **لولایی، ف.، ۱۳۷۹.** بررسی تنوع ژنتیکی ماهی *Barbus capito* در استان‌های مازندران و گیلان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه تربیت مدرس. صفحه ۶۹.

۵. **هوشمند، م. ۱۳۸۴.** ژنوم میتوکندری. چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، کرمان. صفحه ۱۲۴.

۶. **Bradley, D.G.; MacHugh, D.E.; Cunningham, P. and Loftus, R.T., 1996.** Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. National Academi of Science. USA. Vol. 93, pp: 5131-5135.

۷. **Bruford, M.; Bradley, D. and Luikart, G., 2003.** DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. National Academi of Science. Vol. 3, pp: 900-910.

۸. **Davidzon, G. and Dimauro, S., 2005.** Mitochondrial DNA and disease. Annals of medicine. Vol. 37, pp: 222-232.

۹. **Graff, C., 1999.** Mitochondrial medicine-recent advances. Journal of Internal Medicine. Vol. 246, pp: 11-23.

۱۰. **Hiendleder, S.; Lewalski, H.; Wassmuth, R. and Janke, A., 1998.** The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. Molecular Biology and Evolution. Vol. 47, pp: 441-448.

۱۱. **Hiendleder, S.; Kaupe, B. and Janke, A., 2002.** Molecular analysis of wild and domestic sheep questions curret nomen clature and provides evidence for domestication from two different subspecies. Royal society. Vol. 69, pp: 893-904.

۱۲. **Liu, R.Y.; Lei, C.Z. and Yang, G.S., 2006.** The Genetic diversity of mtDNA D-loop and the origin of Chinese goats. Acta Genetica Sinica. Vol. 33, No. 5, pp: 420-428.

۱۳. **Javanrouh, A.A.; Khodamoradi, S. and Seyedabadi, H.R., 2016.** D-loop region sequence genetic diversity phylogenetic evolution in sheep. Online Journal of Veterinary Research. Vol. 20, No. 5, pp: 353-361.

۱۴. **Seyedabadi, H.R.; Pahlevan Afshari, K. and Abdulmaleki, A., 2016.** Mitochondrial diversity and phylogenetic structure

of Markhoz goat population. Irainaian Journal of Applied Animal Science. Vol. 6, No. 3, pp: 679-684.

۱۵. **Zhang, Z.H.; Gong, Y.F.; Liu, Z.Z.; Jia, Q. and Wang, L.Z., 2006.** The polymorphism of mtDNA D-loop of Chinese sheep breeds. Department of Animal Science and Technology. Vol. 28, pp: 165-170.