نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۳، زمستان ۱۳۹۵
ص‌ص: ۱۳۵~۱۴۰

بررسی خصوصیات ژنتیکی بز مرخز براساس توالی ژن سیتوکروم b

- **محسن عبدالملکی**

فارغ التحصیل کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر

- **کیان پهلوان افشاری**

استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر، زنجان.

- **حمید رضا سیدآبادی** (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. کرج. ایران..

تاریخ دریافت : اسفند ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۹۶۴۳۵۷۸۵

Email: h_seyedabadi@yahoo.com

چکیده

حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت بز مرخز به عنوان سرمایه ملی بسیار حائز اهمیت است. بررسی توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b میتوکندری در درون جمعیت‌ها می‌تواند شاخص مناسبی از میزان تنوع موجود در جمعیت مورد مطالعه باشد. هدف از این پژوهش، بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندری بز مرخز است. بدین منظور از ٤٠ رأس بز مرخز نمونه خون جمع‌آوری گردید. پس از استخراج DNA، تکثیر قطعه ۸۹۲ جفت بازی ناحیه سیتوکروم b میتوکندری توسط آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. قطعات تکثیر شده پس از خالص‌سازی به صورت رفت و برگشت توالی‌یابی شدند. تعداد ٤ هاپلوتیپ مختلف بر اساس ٤ نوکلئوتید چند شکل تعیین گردیدند. تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی در نژاد بز مرخز به ترتیب ۰/۱ و ۰/۰۰۲٤ برآورد شد. نتایج فیلوژنتیکی با استفاده از روش UPGM نشان داد که بز مرخز در گروه مجزا نسبت به سایر نژادهای آسیایی قرار دارد. دلیل این فاصله احتمالا ناشی از فاصله جغرافیایی زیاد بین محل پراکنش بز مرخز با سایر نژادهای بز می باشد.

واژه‌های کلیدی: بز مرخز، ژنوم میتوکندری، سیتوکروم **b**، فیلوژنی

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 113 pp: 135-140

The genetic characteristics of Marghos goat based on Cytochrome B gene

By: Kian.Pahlevan Afshari[1], Hamid Reza Seyedabadi[2], Mohsen Abdolmaleki[1]
1:Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Abhar Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
2:Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO),Karaj,Iran

Received: March 2016 **Accepted: May 2016**

Preservation of genetic diversity in population of Marghos goat is very important. Studying cytochrome b region of mitochondrial genome in within breeds can give useful information about genetic diversity of the population. The purpose of current research was genetic and phylogenetic investigation of mitochondrial genome cytochrome b region in Marghos goat. In order to, blood samples were collected from 40 Marghos goats. After extracting DNA, fragment 892 bp of cytochrome b region genome mitochondrial amplified by primers was designed and fragment amplified after purification was sequenced. Four different haplotypes were determined based on four single nucleotide polymorphism sequences. The haplotype and nucleotide diversity were estimated in Marghos goat population 0.1 and 0.00239 respectively. Using the UPGM phylogenetic test results showed that the Marghos goat population is separate group from other Asian goat breeds. The reason for this gap may be due to the geographic distance between the distributions of in Marghos goat with other breeds goats.

Key words: Cytochrome b, Marghos goat, Mitochondrial Genome, Phylogeny

مقدمه

نژادهای بومی هر کشور به عنوان سرمایه ملی و محصول استراتژیک مطرح می‌باشند. از طرفی پرورش و نگهداری بز در بهبود اقتصاد خانوارهای روستایی اهمیت زیادی دارد. بز مرخز تنها نژاد تک پوششی ایران است که در استان‌های کردنشین غرب کشور پراکنده است (توکلیان، ۱۳۸۷). این نژاد جزء نژادهای در معرض خطر انقراض کشور می‌باشد که شناخت دقیق‌تر و کسب اطلاعات ژنتیکی بیشتر در مورد آن‌ها به جهت حفظ آن برای نسل‌های آینده ضروری به نظر می‌رسد. یکی از کاربردی‌ترین راه-های شناسایی ژنتیکی این نژاد استفاده از تکنیک مولکولی به خصوص استفاده از ژنوم میتوکندریایی(mtDNA) است که اساس این‌گونه تحقیقات بر پایه استخراج DNA، خالص سازی محصولات PCR و توالی‌یابی می‌باشد(Pirani و همکاران، ۲۰۱۰). میتوکندری اندامکی سیتوپلاسمی است، که در بیشتر سلول‌های بدن وجود دارند. این اندامک قادر به تولید انرژی برای سلول است و دارای DNA حلقوی اختصاصی و مستقل از DNA هسته‌ای است و در گونه‌های جانوری ۳۷ ژن را کد می-کند، که شامل ۱۳ ژن کد کننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کد کننده tRNA و۲ ژن کد کننده rRNA است و طول تقریبی آن در بز حدود ۱۶۷۰۰ جفت باز می‌باشد (Mohammadi Pestehbig و همکاران، ۲۰۱۱). از مزایای mtDNA می‌توان به بیش از هزار نسخه به ازای هر سلول، کوچک بودن اندازه آن نسبت به DNA ژنومی، وراثت پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی در آن‌ها، امکان تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و توالی‌یابی نواحی حفاظت شده و نواحی حفاظت نشده که برای مطالعات تکاملی گونه‌ها وابسته می‌باشد اشاره نمود (Bellagamba و همکاران، ۲۰۰۱). اولین توالی کامل ژنوم میتوکندری بز به طول ۱۶۷۱۵ جفت باز و طول قطعات ژنی آن از قبیل ناحیه Cty-b به طول ۱۱۳۹ جفت باز توسط Takada و

همکاران (۱۹۹۷)، گزارش گردید. سیتوکروم b، یکی از مهمترین ژن‌های کد کننده DNA میتوکندری می‌باشد که به دلیل داشتن توارث مادری، کمترین نرخ نوترکیبی در آن رخ می‌دهد به همین جهت در مطالعات فیلوژنتیکی در گونه‌های مختلف بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد(Luikart و همکاران، ۲۰۰۱). Pakpahan و همکاران (۲۰۱۶)، ساختار ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی ۹ جمعیت بز بومی اندونزی را بر اساس توالی ناحیه سیتوکروم b مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه دیگر، توالی ناحیه Cyt-b در بز بومی اندونزیایی (نژاد Kejobong) بررسی و روابط فیلوژنتیک این نژاد با سایر نژادهای بز ، مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه فوق ۷ عدد SNP در ناحیه Cyt-b مورد شناسایی قرار گرفت(Sutopo and Kurnianto، ۲۰۱۴). هدف از مطالعه اخیر بررسی و تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه Cyt-b از DNA میتوکندریایی بز مرخز است تا ضمن دستیابی به اطلاعاتی در خصوص ویژگی‌های ژنتیکی این نژاد و مقایسه با سایر نژادها، توالی به‌دست آمده برای این توده بومی در بانک جهانی ژن ثبت شود.

مواد و روش ها

در این تحقیق از تعداد ۴۰ رأس بز نژاد مرخز از محل پراکنش آن در استان کردستان و با اطمینان از عدم رابطه خویشاوندی بین نمونه‌ها، خونگیری صورت گرفت. نمونه‌های خون به مقدار ۵ میلی‌لیتر از سیاهرگ وداج گردنی، در تیوب‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA اخذ و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش اصلاح شده نمکی (Miller و همکاران، ۱۹۹۸) انجام شد.کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Nano Drop-ND 2000 (Thermo، آمریکا) سنجیده شد. طراحی آغازگر برای تکثیر بخشی از توالی ژن Cyt-b از mtDNA با استفاده از نرم افزار Primer premier 5 (Premier Biosoft, USA) و ژنوم کامل میتوکندری بز اهلی (شماره دسترسی KR866125.1) صورت گرفت. توالی آغازگرهای طراحی شده به صورت زیر بود: Forward 5´- CGATACATACACGCAAACGGA - 3´ Reverse 5´- AGAAGGTTGTTTTCAATGGTGC- 3´ با استفاده از رویه BLAST موجود در پایگاه بانک جهانی ژن[1] ، میزان همپوشانی آن‌ها با توالی‌های موجود، مقایسه گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه ۸۹۲ جفت بازی ناحیه ژنی Cyt-b از mtDNA توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal براساس روش استاندارد انجام گرفت. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل mM Tris-HCL(PH 8.8) 100، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۰/۲mM از هر dNTP، ۱/۵ mM از $MgCl_2$، ۵ pmol از آغازگر اختصاصی ژن و ۱۰۰ نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، در ۳۵ چرخه و یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، خالص سازی و به همراه ۵۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت MacroGenکره جنوبی ارسال گردید. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی یابی شدند. سپس با استفاده از ابزار BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های به‌دست آمده سنجیده شد. به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نژادهای مورد مطالعه، نمودار درختی با استفاده از رویه UPGMA توالی‌های هم‌ردیف شده، به کمک نرم افزار Bioedit (Hall ، ۱۹۹۹) ترسیم گردید. همچنین برای تعیین هاپلوتیپ‌ها از رویه Disparity Index Analysis نرم افزار MEGA6 (Tamura و همکاران، ۲۰۱۳) استفاده شد.

[1] - National Center for Biotechnology Information(NCBI)

نتایج و بحث

استخراج DNA از تمام نمونه‌ها با موفقیت انجام گرفت. نتایج طیف سنجی نشان دادند که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار است. الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی آگارز ۱ درصد نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعه اختصاصی برای سیتوکروم b به طول ۸۹۲ جفت باز تکثیر نمودند. قطعه ۸۹۲ جفت بازی به‌دست آمده از توالی‌یابی، ویرایش و قطعه ۸۳۵ جفت بازی در همه نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۴ هاپلوتیپ از بین توالی‌های مورد بررسی تعیین شدند، که دارای ۴ جایگاه چند شکل (SNP) بودند. در یک جایگاه جهش جانشینی حاصل تبدیل نوکلئوتید پورینی به پورینی و سه جایگاه حاصل تبدیل نوکلئوتید پورینی به پیریمیدینی مشخص گردید (جدول ۱).

جدول ۱- نوکلئوتیدهای متفاوت در بین نمونه‌های توالی‌یابی شده و تعیین هاپلوتیپ‌های مختلف ناحیه cytb

موقعیت					
۶۲۴	۵۲۰	۳۶۲	۱۶۳	فراوانی از ۴۰	هاپلوتایپ
A	T	T	A	۱۷	۱
A	C	T	G	۱۲	۲
C	C	A	G	۳	۳
A	T	A	G	۸	۴

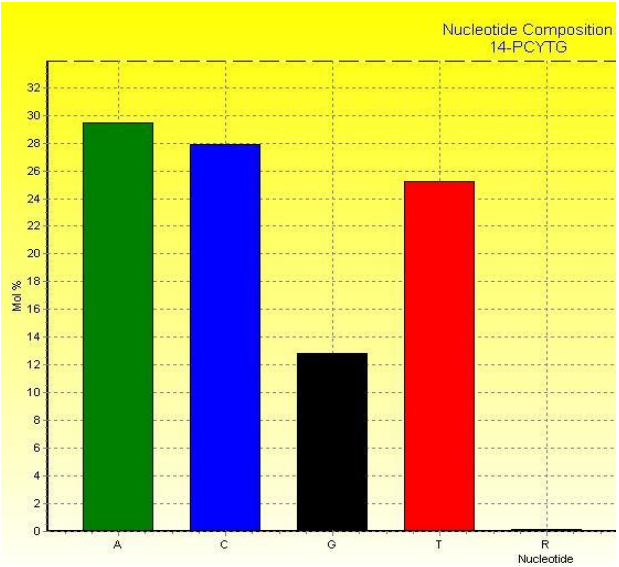
بررسی‌های انجام شده مشخص نمود که همه جهش‌های اتفاق افتاده در این ناحیه از نوع جهش‌های بی‌معنی[۲] می‌باشند. این نتیجه دلالت بر این داردکه ناحیه سیتوکروم b یک ناحیه کد کننده می-باشد و میزان جهش و تنوع در آن پایین است (Awadalla and Eyre-walker ، ۲۰۰۱). تعیین توالی‌های مورد توافق[۳] ، یکی از روش‌های معمول جهت ثبت و شناسایی نژادهای مختلف می‌باشد. توالی سیتوکروم b به طول ۸۳۵ جفت باز به عنوان توالی شاخص در بز مرخز تعیین گردید. محتوای توالی مورد توافق به دست آمده از هاپلوتایپ‌ها شامل، ۲۹/۸۹٪ آدنین، ۲۸/۳۲٪ سیتوزین، ۱۳/۸۱٪ گوانین و ۲۵/۸۶٪ تیمین بود. این یافته با اکثر نتایج تحقیقاتی که درصد A+T را نسبت به درصد G+C در سیتوکروم b، بیشتر گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد (Chen و همکاران، ۲۰۰۶ ;Pakpahan و همکاران، ۲۰۱۶).

Chen و همکاران (۲۰۰۶)، در بررسی کامل ناحیه سیتوکروم در ۱۴ نژاد بز بومی چینی، ۴۴ جایگاه چند شکل و ۴۶ هاپلوتیپ گزارش کردند و مشابه با تحقیق حاضر هیچ حذف و اضافه نوکلئوتیدی در ناحیه سیتوکروم مشاهده نکردند و همه آن‌ها از نوع جایگزینی بودند. همچنین، Papkahan و همکاران (۲۰۱۶)، توالی کامل ناحیه سیتوکروم b را در ۹ نژاد بز بومی اندونزیایی توالی‌یابی و ۱۹ جایگاه چند شکل و ۸ هاپلوتیپ برای این ناحیه گزارش کردند. از آن‌جائی‌که تعداد جایگاه‌های چند شکل وابسته به تعداد نمونه می‌باشند، لذا از پارامتر دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی (π) یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید استفاده گردید، که تحت تاثیر طول DNA و اندازه نمونه نبوده و عبارت از متوسط تفاوت نوکلئوتیدی بین دو توالی در هر جایگاه می باشد (Nei and Kumar ، ۲۰۰۰). مقدار تنوع هاپلوتیپی در جمعیت حاضر ۰/۱ برآورد گردید، که بیانگر سطح پایین تنوع در جمعیت بز مرخز می‌باشد. تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت حاضر ۰/۰۰۲۳ به-دست آمد که در محدوده متوسط تنوع نوکلئوتیدی در

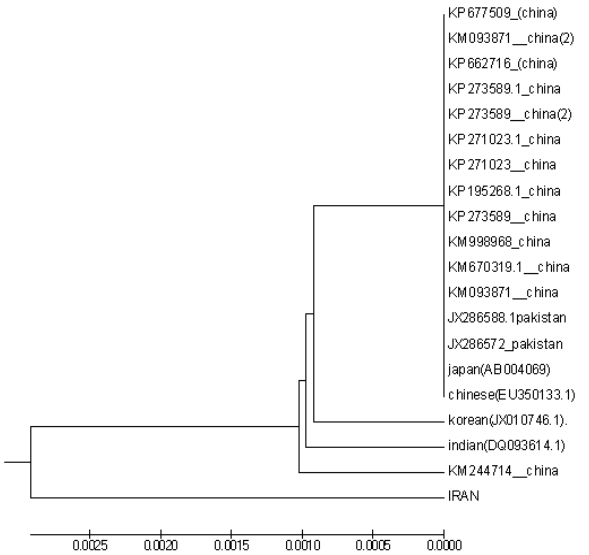
[۱]- Nonsense mutations

[۲]- Consensus

یوکاریوت‌ها که بین ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۱۹ می‌باشد، قرار گرفت (Nei، ۱۹۸۷). Chen و همکاران (۲۰۰۶) ، در تحقیق خود بر روی ۱۴ نژاد بز بومی چینی، تنوع هاپلوتیپی در جمعیت‌های مورد مطالعه را بین ۰/۶ تا ۱/۰ گزارش کردند که بسیار بیشتر از تنوع هاپلوتیپی مشاهده شده در جمعیت بز مرخز می‌باشد. همچنین آن‌ها در تحقیق خود تنوع نوکلئوتیدی را در جمعیت‌های مورد مطالعه، بین ۰/۰۰۱۵ تا ۰/۰۱۵۷ گزارش نمودند. علت پایین بودن تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی در جمعیت بز مرخز، احتمالا ناشی از کاهش شدید جمعیت موثر این نژاد و تأییدی بر در معرض خطر انقراض بودن این نژاد با ارزش می‌باشد. با استفاده از ابزار BLAST نتایج تعیین درصد تشابه توالی ناحیه سیتوکروم b بز مرخز با توالی‌های ثبت شده در پایگاه NCBI نشان داد کهاکثر توالی‌ها در سطح ۹۹ درصد بیشترین تشابه را با توالی ناحیه سیتوکروم بز مرخز داشتند که این نتیجه دلالت بر این دارد که ناحیه سیتوکروم b یک ناحیه حفاظت شده است و تغییرات نوکلئوتیدی در آن به ندرت رخ می‌دهد (Eyre- Awadalla walker and ، ۲۰۰۱). نمودار فیلوژنی توالی ناحیه سیتوکروم b بز مرخز و نژادهای بز آسیایی موجود در NCBI نشان داد که توالی ناحیه سیتوکروم b در بز مرخز در یک گروه جداگانه و با فاصله بسیار زیاد از سایر نژادهای بز آسیایی قرار گرفته است(شکل ۱). دلیل این فاصله احتمالا ناشی از فاصله جغرافیایی زیاد بین محل پراکنش بز مرخز با سایر نژادهای بز و وجود موانع جغرافیایی عمده مانند کوهستان و محدودیت تبادل ژنتیکی طبیعی این جمعیت با سایرجمعیت‌ها و همچنین تفاوت‌های فنوتیپی آشکار آن با سایر نژادها می‌باشد. این نتایج با نتایج تحقیقات جوانروح (۱۳۸۱) و نژادگشتی(۱۳۸۳)، که تنوع ژنتیکی بز مرخز را با استفاده از تکنیک‌های RAPD و ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند، مطابقت دارد. در پژوهش Chen و همکاران (۲۰۰۶)، که به منظور بررسی منشأ مادری و تعیین روابط فیلوژنتیک ۱۴ نژاد بز بومی چینی انجام گرفت، نتیجه گرفتند که اکثر نژادهای بومی چین در یک گروه قرار گرفته و منشأ آن‌ها از بزهای بومی آسیای مرکزی می‌باشد.



شکل۱- درصد ترکیب نوکلئوتیدی توالی مورد توافق برای **cytB**



شکل ۲- نمودار فیلوژنی براساس توالی سیتوکروم b بز مرخز و برخی نژادهای بز آسیایی موجود در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آن‌ها.

نتیجه گیری کلی:

با توجه به نتایج حاصل شده از این تحقیق، می‌توان گفت که شناسایی توالی ناحیه سیتوکروم b به عنوان مشخصه ژنتیکی ثابت هر نژاد، به تهیه شناسنامه ژنتیکی و نگهداری خلوص نژادهای بومی کمک می‌کند. پایین بودن تنوع ژنتیکی بز مرخز، می‌تواند گویای خلوص نژادی در جمعیت مورد مطالعه و بیانگر نیاز به برنامه‌ریزی اصلاح نژادی در این جمعیت برای بالا بردن توان

مقابله با شرایط نامطلوب احتمالی و جلوگیری از خطر انقراض باشد. البته این ناحیه یک ناحیه کد کننده می‌باشد و از این لحاظ میزان جهش و تنوع در آن پایین است.

در نتیجه مطالعه روی نواحی با تنوع بالاتر مانند ناحیه D-Loop می‌تواند نتایج مطمئن‌تری را تولید نماید.

منابع

توکلیان، ج. (۱۳۸۷). نگرشی بر ذخایر ژنتیکی دام و طیور ایران. انتشارات موسسه تحقیقات علوم دامی کشور.ص ص. ۲۰۵-۲۰۹.

جوانروح علی آباد، ع.(۱۳۸۱). بررسی تنوع ژنتیکی شش توده بز بومی ایران با استفاده از نشانگر RAPD. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

نژاد گشتی، م. (۱۳۸۳). بررسی مولکولی تعدادی از نشانگرهای ریزماهواره در شش توده بز بومی ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

Bellagamba, F., Moretti, V.M., Comincini, S. and 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.

Chen, S., Fan, B., Liu, B., Yu, M. and Zhao, S. (2006). Genetic variations of 13 indigenous Chinese goat breeds based on cytochrome b gene sequences. *Biochemical Genetics*. 44: 87-97.

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

Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 41: 95–98.

Luikart, G., Gielly, L., ExcoYer, L., Vigne, J. D., Bouvet, J. and Taberlet, P. (2001). Multiple origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98: 5927–5932.

Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16: 1215.

Mohammadi Pestehbig, F., Pirani, N., Shoja, J. and Mohammadhashemi, A. (2011). Determination the mtDNA D-loop Sequence in Marandi Native Chicken Population and Its Phylogenic Relationships with Other Breeds. *Research Journal of Animal Sciences*. 21: 1-9.

Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics* .Columbia Univ Press, NewYork.

Pakpahan, S., Tunas Artama, W., Widayanti, R. and Suparta, G. (2016). Genetic Characteristics and Relationship in Different Goat Populations of Indonesia Based on Cytochrome B Gene Sequences. *Asian Journal of Animal Sciences*.10:29-38.

Pirani, N., Mohammadhashemi, A., Alijani, S., Rezazadeh Goli, R. and Ghanbari, S. (2010). Molecular Analysis of Mazandrani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA. *Journal Agriculture Biotechnology*. 1: 53-60.

Sutopo, J. and Kurnianto, E. (2014). The genetic diversity of Kejobong goat based on Cytochrome B gene.Journal of the Indonesian. *Tropical Animal Agriculture*. 39: 75-82.

Takada, T., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Kawakami, S. and Amano, T. (1997). Bezoar (C. aegagrus) is a matriarchal candidate for ancestor of domestic goat (C. hircus): evidence from the mitochondrial DNA diversity. *Biochemical Genetics*. 35: 315-326.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.