

تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه سیتوکروم b در مرغ خزک سیستان

احمد ابراهیم زاده اله آباد^۱، امین شهابی^۲، زهرا پزeshkian^{۳*}

Genetic analysis of the cytochrome b sequence in Khazak native chickens of Sistan

Ahmad Ebrahimzadeh-Alahabad¹, Amin Shahabi², Zahra Pezeshkian^{3*}

۱- کارشناس ارشد اصلاح نژاد دام، پژوهشکده دامهای خاص، پژوهشگاه دانشگاه زابل

۲- دانشجوی دکتری اصلاح نژاد دام، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشجوی دکتری اصلاح نژاد دام، دانشگاه گیلان

1. Master graduate of Animal breeding, Special livestock Institute, Research center of the University of Zabol
2. PhD Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3. PhD Student, Animal Science Department, University of Guilan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Zahra_pezeshkian@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱)

چکیده

لزوم حفظ ذخایر ژنتیکی طیور بومی و نیز استفاده از این موجودات به عنوان مواد ژنتیکی پایه در برنامه‌های اصلاح نژادی طیور کشور، کسب اطلاعات و شناخت دقیق‌تر از این حیوانات را ضروری می‌سازد. هدف از این پژوهش، بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی مرغ خزک سیستان با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ناحیه سیتوکروم b میتوکندری بود. بدین منظور از ۲۰ قطعه مرغ خزک سیستان نمونه خون جمع‌آوری گردیده و پس از استخراج DNA، تکثیر قطعه ۸۶۴ جفت بازی ناحیه سیتوکروم b میتوکندری توسط آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. قطعات تکثیر شده پس از خالص سازی توالی‌یابی شدند. تعداد ۵ هاپلو تیپ مختلف براساس ۳ نوکلئوتید چندشکل موجود در توالی‌ها تعیین گردید. توالی‌های نهایی بدست آمده از هر هاپلو تیپ با طول تقریبی ۷۸۹ جفت باز شامل ۲۶/۳۷ درصد آدنین، ۱۳/۳۱ درصد گوانین، ۳۶/۵۰ درصد سیتوزین و ۲۳/۸۲ درصد تیمین بود. نتایج نشان داد که مرغ بومی خزک با مرغ‌های ژاپن و چین تفاوت ژنتیکی کمتری دارد.

واژه‌های کلیدی

فیلوژنی،

سیتوکروم b،

مرغ بومی خزک سیستان،

ژنوم میتوکندری،

هاپلو تیپ

مقدمه

توده‌های بومی در هر کشور بعنوان یک سرمایه ملی و محصول کلیدی مطرح می‌باشند که حفظ و تکثیر آنها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است، زیرا این موجودات بعد از هزاران سال انتخاب طبیعی و با غلبه بر شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند. مرغ‌های بومی علاوه بر اهمیتی که در بهبود اقتصاد خانوارهای روستایی دارند، یک ذخیره مهم ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی طیور هستند و شناخت دقیق‌تر و کسب اطلاعات بیشتر در مورد آنها جهت حفظ این ذخایر ژنتیکی ضروری به نظر می‌رسد (Pirani et al., 2010).

یکی از راه‌های شناسایی این نژادها استفاده از ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) است. میتوکندری اندامکی سیتوپلاسمی است که در بیشتر سلول‌های بدن وجود دارند. این اندامک که قادر به تولید انرژی برای سلول است دارای DNA حلقوی اختصاصی و مستقل از DNA هسته‌ای است و در گونه‌های جانوری ۳۷ ژن را کد می‌کند که شامل ۱۳ ژن کدکننده زنجیره تنفسی، ۲۲ ژن کدکننده tRNA و ۲ ژن کدکننده rRNA است و طول تقریبی آن در طیور ۱۶ هزار جفت باز است (Mohammadi Pestehbig et al., 2011). میتوکندریایی در تشخیص گونه‌ها و ترسیم روابط فیلوژنتیکی دارای مزیت‌هایی از جمله تعداد زیادی 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 است (Bellagamba et al., 2001). توالی‌یابی ژنوم میتوکندری یکی از بهترین و رایج‌ترین روشها برای طبقه‌بندی ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌های نزدیک به هم، بررسی امکان اشتقاق گونه‌های مختلف از یک جد مشترک، مطالعه رابطه فیلوژنی هر موجود با سایر گونه‌ها و نژادها و دستیابی به راهکارهایی

برای حفظ ذخایر ژنتیکی می‌باشد. بررسی شباهت توالی‌ها به کمک تعیین توالی کل ژنوم به پیش‌بینی محل و عملکرد نواحی کدکننده پروتئین‌ها و نواحی تنظیم رونویسی و دیگر نواحی DNA ژنومی منجر خواهد شد.

بخشی از ژنوم میتوکندری، منطقه سیتوکروم b (Cytb) است که شناسایی توالی این مناطق به عنوان مشخصه ژنتیکی ثابت محسوب می‌شود و به تهیه شناسنامه ژنتیکی و نگهداری خلوص نژادهای بومی کمک می‌کند و با مقایسه گونه‌ها و نژادها دیگر که در سالهای مختلف مطالعه شده است و توالی آنها در بانک ژن موجود است امکان مطالعات فیلوژنتیکی، بررسی انشقاق گونه‌ها و فاصله نسلی را فراهم می‌کند. از طرفی توالی‌یابی این مناطق شاخص مناسبی از میزان تنوع موجود در جمعیت بوده و امکان تشخیص گونه‌ها و نژادها را فراهم می‌کند و به حفظ گونه‌های بومی از خطر انقراض و اختلاط ژنتیکی با سایر نژادها کمک می‌کند (Hiendleder et al., 1998). بنابراین مطالعه توالی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندری به منظور شناسایی بهتر طیور بومی ضروری است.

بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها با استفاده از میتوکندری از سال ۱۹۷۹ شروع شد. از آن زمان به بعد مطالعات تئوری و تجربی این اندامک بسیار متغیر به دانش ما درباره جمعیت‌های جانوری افزوده است. اولین توالی کامل ژنوم میتوکندری مرغ به طول ۱۶۷۷۵ جفت باز و طول قطعات ژنی آن از قبیل ناحیه Cyt-b به طول ۱۱۴۲ جفت باز با کد دسترسی X52392.1 گزارش شد (Desjardins and Morais, 1990). در مطالعه ای توالی کامل ژن Cyt-b در ۹ گونه پرندگان و ۱۳ گونه قرقاول آفریقایی و بلدرچین ژاپنی گزارش شده است (Kornegay et al., 1993). از آن زمان تاکنون مطالعات بر پایه توالی ژنوم میتوکندری سرعت گرفته است. در مطالعه دیگری توالی ناحیه Cyt-b میتوکندری به طول

مشخص شد و کیفیت آن روی ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد.

طراحی آغازگرها جهت تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی به طول ۸۶۴ جفت باز با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 انجام شد. آغازگرهای رفت در فاصله ۱۴۹۲۹-۱۴۹۰۶ و آغازگرهای برگشت در فاصله ۱۵۷۴۵-۱۵۷۶۹ از ژنوم میتوکندریایی متصل شدند. توالی آغازگرها مورد استفاده به شرح زیر بود:

Forward: 5'-CACCCAACATTTCGAAAATCCCA -3'

Reverse: 5'-CAAGTTTGTGGGGATGGAGCGTAG -3'

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط دستگاه ترموسایکلر Biometra مدل T-personal با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت. واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۱۰ دقیقه، ۳۴ سیکل دمایی با دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه انجام شد. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و اجزای واکنش شامل ۱۷/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر بافر X₁₀، ۱ میکرولیتر MgCl₂ ۵۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر از مخلوط پرایمر ۵ پیکومولار و ۰/۲ واحد آنزیم Taq پلیمرز بود. محصولات PCR به منظور تأیید تکثیر ناحیه مورد نظر طی واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند و نتیجه در دستگاه ژل داکيومنت مورد بررسی قرار گرفت.

مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR، خالص‌سازی شده و به همراه ۲۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور تعیین توالی به شرکت MACRO GEN کره جنوبی ارسال شدند و نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند.

۱۱۴۰ جفت باز در مرغ بومی ژاپن نژاد گوشتی Chunky که متعلق به لاین تجاری کورنیش است بررسی و روابط فیلوژنتیک و مسیر و منشأ مادریشان مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه فوق ۹ عدد SNP از ۱۸ هاپلوטיפ از ۷ گروه هاپلوئیدی مشخص شد (Shen et al., 2002). همچنین در تحقیقی که بر روی ژنوم میتوکندری ۱۴۰ پرندۀ از زیر گونه‌های مرغ جنگلی انجام گرفت ۴۴ عدد SNP از ۴۲ هاپلوטיפ از ۶ گروه هاپلوئیدی شناسایی شد (Silva et al., 2008).

با استفاده از توالی ناحیه ای از ژنوم میتوکندری تجزیه و تحلیل مولکولی جمعیتی از مرغان بومی مازندران انجام شد (Pirany et al., 2010). مطالعه ای روی مرغان بومی مرندي به منظور تعیین توالی بخشی از ژنوم میتوکندری و ترسیم رابطه فیلوژنی آن با سایر مرغان اهلی انجام گرفت (Mohammadi Pestehbig et al., 2011). طی مطالعه ای دیگر تجزیه و تحلیل ژنتیکی ناحیه سیتوکروم b مرغ بومی خراسان صورت گرفت (Nassiri and Roudbari, 2014).

از آنجاییکه مرغ خزک یک نژاد بومی منطقه سیستان است و هیچ گونه مطالعه ای در جهت تعیین ساختار ژنتیکی و رابطه فیلوژنتیکی این نژاد انجام نگرفته است، هدف از این مطالعه بررسی و تجزیه و تحلیل ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه Cyt-b از DNA میتوکندریایی مرغ بومی خزک سیستان است.

مواد و روشها

نمونه‌های خون به طور تصادفی از تعداد ۲۰ قطعه مرغ خزک گرفته شد. این نمونه‌ها از هر دو جنس مرغ خزک پژوهشکده دامهای خاص پژوهشگاه دانشگاه زابل جمع آوری شد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت دنا زیست انجام گرفت. کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND 2000 شرکت Thermo امریکا

درصد نوکلئوتیدها در این ناحیه از mtDNA مرغ اهلی ثبت شده در NCBI که به عنوان اجداد مرغان اهلی امروز مطرح است (جدول ۱). توالی‌های نهایی بدست آمده از هر هاپلوتیپ با طول تقریبی ۷۸۹ جفت باز شامل ۲۶/۳۷ درصد آدنین، ۱۳/۳۱ درصد گوانین، ۳۶/۵۰ درصد سیتوزین و ۲۳/۸۲ درصد تیمین بود.

از آنجائیکه تعداد جایگاه‌های چند شکلی به تعداد نمونه وابسته می‌باشند، لذا از پارامتر دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی (π) یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید استفاده شد که به طول DNA و اندازه نمونه بستگی ندارد و عبارت از متوسط تفاوت نوکلئوتیدی بین دو توالی در هر جایگاه است (Nei and Kumar, 2000). تنوع نوکلئوتیدی (π) در جمعیت مرغ بومی خزک مورد مطالعه در این پژوهش ۰/۰۰۱ تخمین زده شد. تنوع نوکلئوتیدی در جمعیت مرغ مازندرانی ۰/۰۰۵۱ تخمین زده شد (Pirani et al., 2010). مقدار تنوع هاپلوتیپی در جمعیت حاضر ۰/۶۳ برآورد شد که در دامنه مقدار تنوع هاپلوتیپی گزارش شده (۰/۷۸-۰/۲۹) برای مرغان آسیای جنوب شرقی، مرغان زیمبابوه ای با منشا هندی و برخی لاینهای تخمگذار و گوشتی تجارتي و خیلی نزدیک به مقدار گزارش شده برای لاینهای گوشتی تجاری است (Munchadeyi et al., 2008). در صورتی که این مقدار برای برخی از جمعیت‌های مرغ ویتنامی خیلی زیاد (۰/۹۴) گزارش شده است (Cuc et al., 2011). که نشان دهنده تنوع متوسط و پایین در این جمعیت است. همچنین مقدار تنوع هاپلوتیپی برای جمعیت مرغ بومی خراسان ۰/۵ گزارش شده که بیانگر سطح تنوع پایین در جمعیت مذکور است (Nassiri and Roudbari, 2014). این مقدار برای مرغ مازندرانی ۰/۷۴۲۴ گزارش شد (Pirani et al., 2010).

توالی مورد توافق ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI تحت فرایند BLAST مورد مقایسه قرار گرفتند. طی این

از ابزار BLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی و همپوشانی توالی‌ها و به منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌ها از نرم‌افزار MEGA v.5 (Tamura et al., 2011) استفاده شد. جهت رسم نمودار فیلوژنی از رویه Neighbor-Joining بر پایه Maximum Likelihood نرم افزار MEGA v.5 و برای رسم ماتریس فواصل ژنتیکی و درصد شباهت توالی ژن Cyt-b از DNA میتوکندریایی مرغ خزک بومی سیستان با توالی‌های مشابه با مرغ‌های موجود در بانک ژن از نرم‌افزار MegAlign استفاده شد.

نتایج و بحث

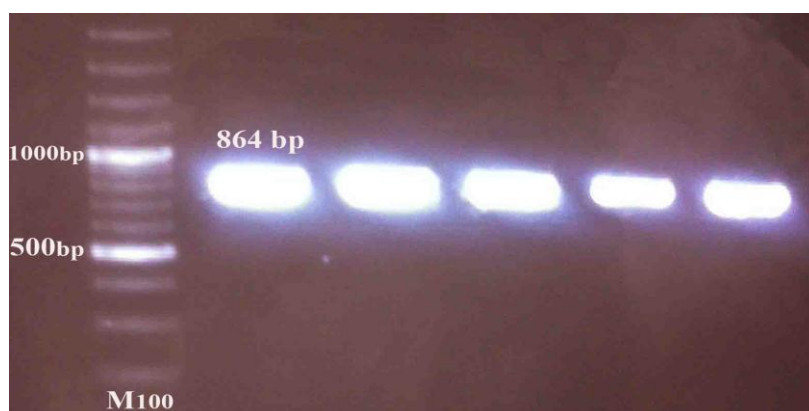
استخراج DNA از خون در تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. الکتروفورز تمام نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان دهنده باندهای به طور کامل شفاف و روشن، فاقد شکستگی و بدون کشیدگی در اثر آلودگی با نمک یا RNA بودند. همچنین شفاف و متراکم بودن باند‌ها بیانگر غلظت بالای DNA و نشان دهنده موفقیت این روش در استخراج DNA از خون کامل در مرغ بومی خزک است.

واکنش PCR نمونه‌ها بر طبق آنچه که در قسمت مواد و روش‌ها شرح داده شد انجام شد. جهت بررسی صحت PCR های انجام شده از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. نتایج الکتروفورز مربوط به نمونه‌ها در شکل ۱ قابل مشاهده است.

نتایج نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به خوبی فعالیت نموده و قطعه اختصاصی برای سیتوکروم b به طول ۸۶۴ جفت باز را تکثیر نمودند. قطعه ۸۶۴ بدست آمده از توالی‌یابی، ویرایش و قطعه ۷۸۹ جفت بازی در همه نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تعداد ۵ هاپلوتیپ در بین ۲۰ نمونه مشاهده شد و در بین هاپلوتیپ‌ها ۳ جایگاه SNP وجود داشت. فراوانی نسبی نوکلئوتیدها در توالی مورد توافق سیتوکروم b مرغ خزک سیستان با

فرایند تعداد ۱۲ توالی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک از کشورهای مختلف که با نواحی مورد مطالعه هم پوشانی داشتند از این پایگاه دریافت و تحت رویه Clustal برنامه MEGA 5 با توالی های بدست آمده در این مطالعه همردیف سازی شدند. فواصل ژنتیکی بین توالی گونه های مورد مطالعه بوسیله نرم افزار CLC Workbench 5 محاسبه گردید. بر اساس این فواصل ژنتیکی در مرحله بعدی از رویه Neighbor-Joining نرم افزار MEGA5 به منظور ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد (شکل ۲). ماتریس فواصل ژنتیکی و نمودار فیلوژنی توالی ناحیه سیتوکروم b ژنوم

میتوکندریایی مرغ بومی خزک و نژادهای مرغ موجود در NCBI نشان می دهد که ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک با توالی مرغ اهلی و نژادهای مرغ در کشورهای چین و ژاپن نزدیکی بیشتری دارد، که این امر ممکن است به دلیل قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک مرغ بومی خزک با نژادهای مرغ در این کشورها باشد، اما با مرغ های Voucher، Cenxi و Tibetan هیچ شباهتی ندارند و در شاخه مجزا قرار گرفته است و بیشترین فاصله ژنتیکی را با این نژادها دارد.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR به طول ۸۶۴ جفت باز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

Fig 1. Electrophoresis of 864 bp PCR Products on 1.5 % Agarose gel.

جدول ۱- مقایسه فراوانی نوکلئوتیدها در توالی ژن سیتوکروم b میتوکندریای مرغ خزک سیستان و مرغ اهلی

Table 1- Comparison of frequency of nucleotides in cytochrome b region in Khazak native chicken of Sistan and Domestic Chicken.

Population	Nucleotides frequency percentage					A+T
	C	G	T	A	G+C	
Khazak native chicken of Sistan	(288) 36.5	(105) 13.31	(188) 23.82	(208) 26.37	49.81	50.19
Domestic chicken	(284) 36.41	(105) 13.46	(186) 23.85	(205) 26.28	(49.87)	50.13

مرغ بومی خزک علاوه بر ثبت این توالی در بانک جهانی ژن برای اولین بار نام مرغ بومی خزک در بانک جهانی ژن آورده می شود و این نژاد به دیگر کشورها معرفی می شود.

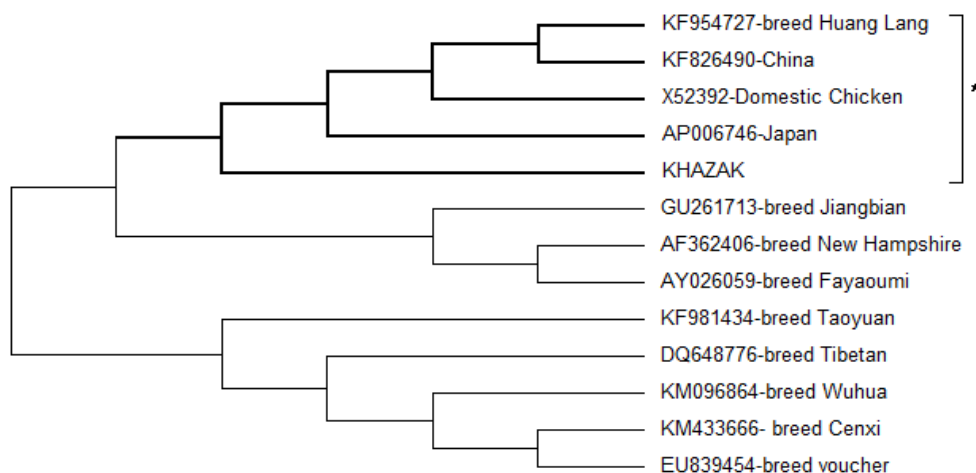
ماتریس فواصل ژنتیکی و نمودار فیلوژنی توالی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک و نژادهای مرغ موجود در NCBI نشان داد که ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک با مرغ اهلی و نژادهای مرغ در کشورهای چین و ژاپن نزدیکی بیشتری دارد، که این امر ممکن است به دلیل قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک مرغ بومی خزک با نژادهای مرغ در این کشورها و بطور کل نژادهای آسیایی باشد.

نتایج پژوهشی که به منظور بررسی منشاء مادری و تعیین روابط فیلوژنتیک ۲۰ نژاد بومی ژاپنی انجام شده بود نشان داد که برخی از نژادهای بومی ژاپن از داخل ژاپن منشاء نگرفته اند و نژادهای سایر کشورها پایه مرغ بومی ژاپنی را تشکیل داده اند، نتایج این پژوهشگران می تواند تأییدی بر نتایج به دست آمده در این پژوهش و دلیل احتمالی وجود قرابت ژنتیکی بین مرغ بومی خزک و نژادهای ژاپنی و چینی باشد (Nishibori et al., 2001). همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که توالی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی مرغ بومی خزک با مرغ های Voucher Cexi, و Tibetan هیچ شباهتی ندارند و در شاخه مجزا قرار گرفته است و بیشترین فاصله ژنتیکی را با این نژادها دارد.

در پژوهشی دیگر که به منظور بررسی منشاء مادری و تعیین روابط فیلوژنتیک ۲۰ نژاد بومی ژاپنی و مرغهای بومی اندونزیایی انجام گرفته است، نتایج نشان داد که بعضی نژادهای منتسب به ژاپن از داخل ژاپن نشأت نگرفته اند و نژادهای سایر کشورها پایه مرغهای بومی ژاپنی را تشکیل می دهند (Oka et al., 2007).

در پژوهشی که بر روی مرغان بومی خراسان انجام گرفته است نتایج حاکی از این است که توالی ناحیه سیتوکروم b در مرغ بومی خراسان با مرغ بومی چین، بومی لاوس و لگهورن سفید نزدیکی بیشتری دارد و بیشترین فاصله ژنتیکی را با نژاد نیوهمشایر دارد (Nassiri and Roudbari, 2014).

در سال های اخیر تعیین توالی نقاطی از DNA میتوکندری برای برخی موجودات به منظور کسب اطلاعات و شناخت دقیق تر از نژادهای بومی انجام شده است، اگر چه انجام تحقیقات در مقیاس وسیع و با تعداد نمونه بالا (Large-Scale) در حال حاضر مقدور نیست اما انجام تحقیقات در مقیاس کوچک (Fine-Scale) و انتخاب توالی بخش هایی از ژن که توالی آنها در بانک ژن موجود است و مقایسه توالی های به دست آمده با آنها می تواند به اطلاعات ما درباره نژادهای بومی کمک کند و زمینه را برای استفاده بهتر از آنها در برنامه های اصلاحی باز کند. با توجه به اینکه هیچ اطلاعاتی از توالی های مربوط به مرغ بومی خزک در بانک جهانی ژن وجود ندارد، با انجام این مطالعه بر روی ناحیه سیتوکروم b ژنوم میتوکندریایی



شکل ۲- نمودار فیلوژنی براساس توالی کلی مرغ بومی خزک و برخی نژادهای مرغ موجود در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آنها.

Fig 2. Phylogenetic tree based on consensus sequences of Khazak native chicken and other chicken breeds are taken from GenBank along with their accession numbers

منابع

- Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, Valfre F. 2001.** Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 49:3775-3781.
- Cuc NTK, Simianer H, Groeneveld LF, Weigend S. 2011.** Multiple maternal lineages of Vietnamese local chickens inferred by mitochondrial DNA D-loop sequences. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences* 24: 155-161.
- Desjardins P, Morais R. 1990.** Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology* 212: 599- 634.
- Eyre-walker A, Awadalla P. 2001.** Does human mtDNA recombine? *Journal of Molecular Evolution* 53: 430- 435.
- Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, 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* 47: 441-448.
- Kornegay JR, Kocher TD, Williams LA, Wilson AC. 1993.** Pathway of lysozyme evolution inferred from the sequence of cytochrome b in birds. *Journal of Molecular Biology*, 37: 367-379.
- Mohammadi Pestehbig F, Pirani N, shoja J, 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(2): 1-9.
- Muchadeyi FC, Eding H, Simianer H, Wollny CBA, Groeneveld E, Weigend S. 2008.** Mitochondrial DNA D-loop sequences suggest a Southeast Asian and Indian origin of Zimbabwean village chickens. *Animal Genetics* 39: 615–622.
- Nassiri MR, Roudbari Z. 2014.** Genetic analysis of cytochrome b region in native chicken of Khorasan. *Journal Agriculture Biotechnology* 6(2): 189-198 (In Farsi with English abstract).
- Nei M, Kumar S. 2000.** *Molecular Evolution and Phylogenetics.* Oxford University Press, New York.
- Nishibori M, Hanazono M, Yamamoto Y, Tsudzuki M, Yasue H. 2003.** Complete nucleotide sequence of mitochondrial DNA in White Leghorn and White Plymouth Rock chickens. *Animal Science Journal.* 74, 437–439.
- Oka T, Ino Y, Nomura K, Kawashima S, Kuwayama T, Hanada H, Amano T, Takada**

- M, Takahata N, Hayashi Y, Akishinonomiya F. 2007.** Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Animal Genetics* 38: 287-293.
- Pirani N, Elyasi Zarringhabaei Gh, Taghizadeh A. 2010.** Genetic relationship of 6 Iranian native chicken populations using RAPD markers. *Animal Science Researches*. 19(1):69-79 (In Farsi with English abstract).
- Pirany N, Mohammadhashemi A, Alijani S, Rezazadeh Goli R, Ghanbari S. 2010.** Molecular Analysis of Mazandrani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA. *Journal Agriculture Biotechnology* 1(2): 53- 60.
- Shen XJ, Ito S, Mizutani M. 2002.** Phylogenetic Analysis in Chicken Breeds Inferred From Complete Cytochrome b Gene Information. *Biochemical Genetics*. 40(3/4), 129-141.
- Silva P, Guan X, Ho-Shing O, Jones J, Xu J, Hui D, Notter D, Smith E. 2008.** Mitochondrial DNA-based analysis of genetic variation and relatedness among Sri Lankan indigenous chickens and the Ceylon jungle fowl (*Gallus lafayetti*). *Animal Genetics* 40: 1-9.
- 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. *Mol Biol Evol.*; 28(10):2731-9.