

## Identification of *Dicrocoelium dendriticum* isolated from small ruminants of east Azerbaijan province using ITS2 and Nad1 gene markers

Abbas Imani Baran<sup>1</sup>,  
Salar Alidoost<sup>2</sup>,  
Ahmad Nematollahi<sup>3</sup>,  
Masoomeh Firouzamandi<sup>4</sup>,  
Behzad Ghorbanzadeh<sup>5</sup>,

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>2</sup> MSc in Veterinary Parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>5</sup> PhD in Medical Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received September 23, 2024; Accepted December 28, 2024)

### Abstract

**Background and purpose:** *Dicrocoelium dendriticum* is the most important liver fluke of the domestic and wild herbivores. Nevertheless, there is scarce data on the genetic characteristics of this important zoonotic trematode. This study aimed to determine the intraspecific variations within *D. dendriticum* samples from sheep and goats in East Azerbaijan province, northwestern Iran, through the analysis of mitochondrial Nad1 and ribosomal ITS2 genes.

**Materials and methods:** In this study, DNA was extracted from the *D. dendriticum* samples. Subsequently, the Nad1 and ITS2 genes were amplified through conventional PCR method. PCR products from each gene for sheep (6 samples) and goat (4 samples) isolates were sent for sequencing. The obtained sequences were edited through BioEdit software and aligned with each other using the ClustalW algorithm in MEGA7.0 software. Similarly, all nucleotide sequences were compared with some sequences deposited in the NCBI, based on BLAST function. Finally, to determine the phylogenetic status of *D. dicrocoelium* isolates, a phylogenetic tree relevant to each gene marker was constructed using the Neighbor-Joining method in MEGA7.0 software to investigate the similarities and differences between isolates from different geographical regions around the world and our *D. dendriticum* samples.

**Results:** The analysis of sequences showed that, among the 4 ITS2 sequences, there was only one additional nucleotide relevant to one of the sheep isolates, while no difference was found among the sequences of Nad1 fragments. In the BLAST comparison, except for a few sequences, 100% similarity was found between our sequences and reference sequences from NCBI. Phylogenetic tree construction indicated that both ITS2 sequences and Nad1 fragments were clearly grouped in a clade, both separately and together, with the majority of selected sequences from NCBI.

**Conclusion:** The haplotype difference was not observed for the Nad1 gene, so it is better to use the ITS2 gene to detect different haplotypes of *D. dendriticum*.

**Keywords:** genetic diversity, *Dicrocoelium dendriticum*, sheep, goat, East Azerbaijan, Nad1, ITS2

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (246): 60-71 (Persian).

**Corresponding Author:** Abbas Imani Baran - Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.  
(E-mail: a.imani@tabrizu.ac.ir)

## تعیین هویت دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از نشخوارکنندگان کوچک استان آذربایجان شرقی با استفاده از ژن های *Nad1* و *ITS2*

عباس ایمانی باران<sup>۱</sup>سالار علی دوست<sup>۲</sup>احمد نعمت الهی<sup>۳</sup>معصومه فیروز امندی<sup>۴</sup>بهزاد قربانزاده<sup>۵</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** دیکروسلیوم دندریتیکوم از مهمترین و شایعترین فلوکهای کبدی علفخواران اهلی و وحشی است. با این وجود، در ارتباط با خصوصیات ژنومی این ترما تود مهم و دارای اهمیت زئونوتیک اطلاعات کمی وجود دارد. این مطالعه با هدف تعیین تنوع درون گونه‌ای در دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از گوسفندها و بزهای استان آذربایجان شرقی، از طریق آنالیز ژن‌های میتو کندریائی *Nad1* و ریپوزومی *ITS2* انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، DNA نمونه‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم استخراج شدند. سپس قطعاتی از ژن‌های هدف از طریق PCR معمولی تکثیر شدند. نمونه‌های PCR از هر قطعه ژن مربوط به ایزوله‌های گوسفندی (۶ نمونه) و بز (۴ نمونه) برای تعیین توالی ارسال شدند. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit تصحیح شدند و با استفاده از الگوریتم ClustalW در نرم‌افزار MEGA7.0 با همدیگر هم تراز شدند. هم‌چنین توالی‌های مربوط به مطالعه‌ی حاضر با تعدادی از توالی‌های ثبت شده در NCBI، با روش BLAST مقایسه شدند تا تشابه‌ها و تفاوت‌های موجود بین ایزوله‌های مطالعه‌ی حاضر با سایر ایزوله‌ها مشخص شوند. در نهایت، برای تعیین موقعیت فیلوژنی ایزوله‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم، درخت فیلوژنی مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA7.0 و با روش Neighbor-Joining ترسیم شد.

**یافته‌ها:** آنالیز توالی‌ها نشان داد که در بین توالی‌های *ITS2* فقط یک نوکلئوتید متفاوت به شکل افزایشی در یک نمونه گوسفندی مشاهده شد و براساس همین تفاوت فقط دو نوع هاپلو تایپ در بین ایزوله‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم مشاهده شد. آنالیز توالی‌های *Nad1* هیچ تفاوت درون گونه‌ای را نشان نداد. در مطالعه حاضر مقایسه توالی‌های *ITS2* و *Nad1*، به جز با چند توالی معدود، شباهت ۱۰۰ درصدی با سایر توالی‌های انتخاب شده از NCBI نشان دادند. با ترسیم درخت فیلوژنی به وضوح مشخص شد که توالی‌های هر کدام از ژن‌ها هم با خود و هم با اکثر توالی‌های NCBI در یک شاخه قرار گرفتند.

**استنتاج:** در این مطالعه با استفاده از ژن *Nad1* تفاوت درون گونه‌ای برای دیکروسلیوم دندریتیکوم مشاهده نشد. بنابراین برای اثبات وجود تنوع درون گونه‌ای دیکروسلیوم دندریتیکوم بهتر است از ژن ریپوزومی *ITS2* استفاده شود.

**واژه های کلیدی:** تنوع ژنتیکی، دیکروسلیوم دندریتیکوم، گوسفند، بز، آذربایجان شرقی، *ITS2*، *Nad1*

Email: a.imani@tabrizu.ac.ir

مؤلف مسئول: عباس ایمانی باران - تبریز: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

۱. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
  ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
  ۳. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
  ۴. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
  ۵. دکتری تخصصی انگل شناسی پزشکی، کارشناس آزمایشگاه مرکزی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۷/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۷/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۱۰/۸

## مقدمه

دیکروسلیوم یکی از شایع ترین ترماتودهایی است که در مجاری صفراوی و کیسه صفراوی طیف وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی و گاهاً انسان ساکن شده و باعث بیماری دیکروسلیازیس می شود. از جنس دیکروسلیوم تاکنون پنج گونه شناخته شده است که عمدتاً نشخوارکنندگان را آلوده می کنند: دیکروسلیوم دندریتیکوم، دیکروسلیوم هاسپس، دیکروسلیوم چائینسیس، دیکروسلیوم سوپریری (مترادف دیکروسلیوم اورینتالیس) و دیکروسلیوم پترووی. گونه های دیکروسلیوم با همپوشانی خیلی کم دارای پراکنش مختلف جهانی هستند، دیکروسلیوم دندریتیکوم در آمریکا، آسیا، شمال آفریقا و اروپا، دیکروسلیوم هاسپس عمدتاً در آفریقا، دیکروسلیوم چائینسیس در آسیا، و دیکروسلیوم سوپریری در اتحاد جماهیر شوروی قدیم و اتریش یافت می شوند (۱، ۲).

به طور کلی، تنوع ژنتیکی بین گونه های و درون گونه ای برای دیکروسلیوم شایع است و این موضوع کنترل دیکروسلیازیس در حیوانات را با مشکل مواجه می سازد (۳). کرم های دارای مورفولوژی مشابه تفاوت های قابل توجهی را در عوامل مهم اپیدمیولوژیکی مانند عفونت زایی، بیماری زایی، آنتی ژنیسیتی و حساسیت در برابر ضد انگل ها نشان می دهند (۴). مطالعات نشان داده اند روش های تشخیصی مورفولوژیکی معمول صرفاً بر روی کرم بالغ یا تخم استوارند، بنابراین توانایی تشخیص تفاوت بین گونه های دیکروسلیوم و همین طور تفاوت های درون گونه ای یا درون جمعیتی گونه ای مهمی چون دیکروسلیوم دندریتیکوم را ندارند. بنابراین، امروزه روش های مولکولی، به عنوان یک روش ایده آل برای تمایز بین ایزوله های انگل و آشکار ساختن تغییرات ژنتیکی انگل ها با استفاده از توالی های DNA ریوزومی (rDNA) و DNA میتوکندریائی (mtDNA)، این مشکل را مرتفع می سازند (۵-۳). تاکنون مطالعات زیادی بر پایه ریخت شناسی و مولکولی برای تشخیص تفریقی گونه های دیکروسلیوم و همچنین تعیین تنوع

ژنتیکی و وجود تفاوت های درون گونه ای در برخی گونه های دیکروسلیوم، به ویژه دیکروسلیوم دندریتیکوم، با استفاده از توالی های rDNA و mtDNA انجام شده است (۱، ۴). بنابر اظهارات محققان، ژن های میتوکندریائی در مقایسه با ژن های ریوزومی برای بررسی تفاوت های ژنتیکی بین افراد یا جمعیت های موجود در گونه های نماتود، ترماتود و سستود، به دلیل وراثت مادری، تکامل سریع و میزان جهش بیش تر در این ژن ها، مناسب تر هستند (۳). صرف نظر از این برتری بیان شده، مطالعات متعددی با استفاده از ژن های میتوکندریائی Cox1 (۳، ۶، ۷)، Nad1 (۳، ۴، ۱۱-۸) و Cytb (۳) و ژن های ریوزومی 18S (۱۲)، 28S (۱، ۲، ۶، ۱۳، ۱۴)، ITS1 (۵، ۱۵)، ITS2 (۱، ۶-۴، ۸، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۶، ۱۷) به تنهایی و یا ترکیبی از چند ژن (۱۵، ۱۷) برای شناسایی گونه های دیکروسلیوم و تعیین تنوع درون گونه ای استفاده شده اند.

به علت ماهیت زئونوتیک دیکروسلیوم دندریتیکوم و خسارات اقتصادی قابل توجه ناشی از آلودگی با این ترماتود، اطلاع از وضعیت اپیدمیولوژی دیکروسلیازیس در جوامع انسانی و دامی حائز اهمیت است. تمامی مطالعات انجام شده در ایران نشان داده اند دیکروسلیوم دندریتیکوم تنها گونه عامل دیکروسلیازیس در دام های اهلی می باشد. طبق بررسی ها در ایران، درصد شیوع نسبی دیکروسلیازیس ناشی از این گونه مهم در بین گوسفندان ۳/۱ درصد (۲/۲-۴/۲)، بزها ۱/۳ درصد (۱/۹-۰/۹) و گاوها ۰/۵ درصد (۳/۵-۱/۱) گزارش شده است (۱۸). در خصوص تعیین هویت مولکولی دیکروسلیوم دندریتیکوم، در سال های اخیر در ایران بررسی هایی توسط پژوهشگران انجام شده است (۴، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۷، ۲۱-۱۹). هدف از مطالعه حاضر تعیین هویت دیکروسلیوم دندریتیکوم از نظر احتمال وجود تفاوت های درون گونه ای در نمونه های جدا شده از گوسفندا و بزهای کشتار شده در کشتارگاه های شهرستان های استان آذربایجان شرقی، با روش مولتی

لوکوس ژنوتایپینگ با استفاده از مارکرهای ژنی *Nad1* و *ITS2* می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

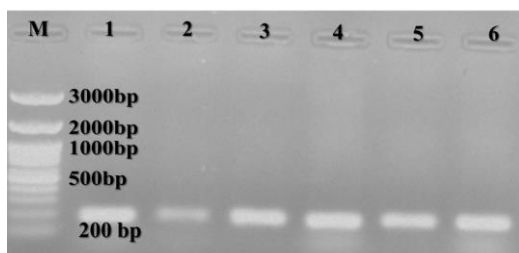
این مطالعه مقطعی در بازه زمانی اول بهمن ۱۴۰۰ تا خرداد ۱۴۰۱ برای بازرسی کشتارگاهی و نمونه‌برداری از کشتارگاه‌های تعدادی از شهرستان‌های استان آذربایجان شرقی (تبریز، اهر، میانه، بناب و مراغه) در نظر گرفته شد. بلافاصله پس از کشتار و تخلیه امعاء و احشاء گوسفندها و بزهای بومی استان، کبدها با برش‌های تخصصی بافت کبد و مجاری و کیسه صفرا بازرسی شده و کبدهای آلوده به دیکروسلیوم دندرتیکوم جداسازی شدند. از هر کشتارگاه، ۱۰ کبد آلوده (گوسفند و بز هر کدام ۵ کبد) برای نمونه‌برداری انتخاب شدند. پس از انتقال کبدهای آلوده به آزمایشگاه انگل‌شناسی، کبدها به مدت دو ساعت در آب نمک رقیق قرار گرفتند. با استفاده از تیغه اسکالپل، قیچی و پنس تمام مجاری موجود در کبد باز شده و تمام کرم‌های بالغ دیکروسلیوم دندرتیکوم جمع‌آوری شدند. کرم‌ها با استفاده از سرم فیزیولوژی یا محلول PBS شست و شو شده و تا زمان استخراج DNA در اتانول ۷۰ درجه نگهداری شدند.

### استخراج، تعیین کیفیت DNA و انجام PCR

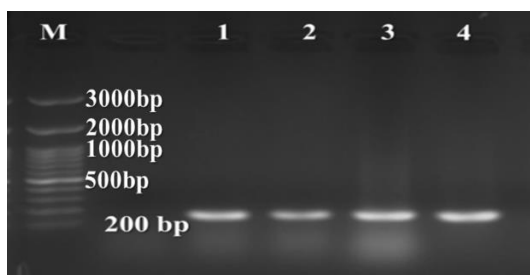
DNA نمونه‌ها با استفاده از روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج شدند (۲۲). نمونه‌های DNA با غلظت‌های متفاوت همراه با یک DNA استاندارد (DNA Ladder, Cinagen, Iran) روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. شدت باندهای DNA نمونه‌ها با باند مربوط به DNA استاندارد مقایسه شدند. از آنجائی که مقدار DNA موجود در هر یک از باندهای DNA استاندارد معلوم می‌باشد، مقدار DNA هر نمونه از طریق مقایسه شدت فلورسنت نمونه با باندهای DNA استاندارد محاسبه شد. برای انجام واکنش PCR، پرایمرهای

اختصاصی برای تکثیر قطعه تقریبی ۲۰۰ جفت باز از دو ژن Nad1F: 5'-GAGAGTTTCACTGTGCAG-3' و Nad1R: 5'-TTTAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3' و ITS2F: 5'-GTTCCCACTCGCTGAGGTATT-3' و ITS2R: 5'-GCTCACCGGCCTCGCTCTG-3' با استفاده از نرم‌افزارهای Primer3 و Fast PCR طراحی شده و از شرکت سیناژن به صورت لئوفیلیزه خریداری شدند. طبق دستور شرکت سازنده، هر واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: یک میکرولیتر از هر پرایمر، ۳ میکرولیتر از هر نمونه DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Taq 2x Master Mix, AmpliqonIII, Denmark) و ۷/۵ میکرولیتر از آب دوبار تقطیر، انجام شد. ضمن قرارگیری میکروتیوب‌ها درون دستگاه ترموسایکلر (MWG AG-BIOTECH, Germany)، برنامه زمانی واکنش PCR برای تکثیر قطعه Nad1 شامل: یک واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل: واسرشت ثانویه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه، و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، انجام شد. برنامه زمانی و شرایط دمایی برای تکثیر قطعه ITS2 مشابه با شرایط تکثیر قطعه Nad1 بود، با این تفاوت که تعداد چرخه مرحله دوم شامل ۳۰ چرخه و مدت زمان برای هر مرحله سه گانه ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شد. تمامی محصولات PCR به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه ذخیره شدند. نمونه‌ها پس از انجام PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. نهایتاً، برای مشاهده ظهور و تعیین با کیفیت‌ترین باندها از صفحات ژل، با استفاده از دستگاه Gel doc، عکس‌برداری شد. لازم به ذکر است تمام مواد مورد استفاده از بهترین موارد برای انجام واکنش PCR بوده (PCR grade) و از شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران) تهیه شدند.

توالی یابی، هم ترازوی و ترسیم درخت فیلوژنی برای توالی یابی ۱۵ میکرولیتر از ۱۰ محصول PCR با کیفیت (۳ مورد از هر ناحیه ژنی *Nad1* و *ITS2* مربوط به گوسفند و ۲ مورد از هر ناحیه مربوط به بز) همراه با ۱۰ میکرولیتر از پرایمرهای مستقیم و معکوس به شرکت سیناژن ارسال شدند. نمونه ها با تکنیک سانگر (Sanger) (dideoxy technique) در دو جهت مستقیم و معکوس توالی یابی شدند. توالی های مستقیم و معکوس به دست آمده از هر نمونه ابتدا با استفاده از نرم افزار Sequencher با هم یکی شدند. توالی های الحاق شده با استفاده از نرم افزار BioEdit v.7.2.6 تصحیح شدند. برای ردیابی تنوع درون گونه ای، توالی های تصحیح شده با استفاده از الگوریتم ClustalW (۲۳) در نرم افزار MEGA7.0 (۲۴) هم تراز شدند. در مرحله بعد توالی های تصحیح شده با توالی های ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) با روش BLAST مقایسه شدند. برای ارزیابی نهایی تفاوت ها و شباهت ها، تعدادی از توالی های ثبت شده در NCBI انتخاب شدند و با توالی های مطالعه حاضر هم تراز و آنالیز شدند. در نهایت درخت فیلوژنی مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار MEGA7.0 و با روش Neighbor-Joining ترسیم شد.



تصویر شماره ۱-۳: الکتروفورز محصولات PCR قطعه 200bp از ژن *ITS2* دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از گوسفند و بز. M: مارکر 100bp؛ ۱-۳: نمونه های بز؛ ۴-۶: نمونه های گوسفند



تصویر شماره ۲-۴: الکتروفورز محصولات PCR قطعه 200bp از ژن *Nad1* دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از گوسفند و بز. M: مارکر 100bp؛ ۱-۲: نمونه های بز؛ ۳-۴: نمونه های گوسفند

بنابراین اگر باز افزایشی اولین کدون باشد، آنگاه توالی جدید CCGT کد کننده اسید آمینه آرژنین (CGT) TC↓GT← آرژنین← آرژنین، اگر دومین کدون باشد، توالی جدید CCG کد کننده اسید آمینه پرولین (CCG) TC↓GT← سرین← پرولین) و اگر سومین کدون باشد، توالی جدید TCC کد کننده اسید آمینه سرین (← TCC CTC↓: لوسین← سرین) می باشد.

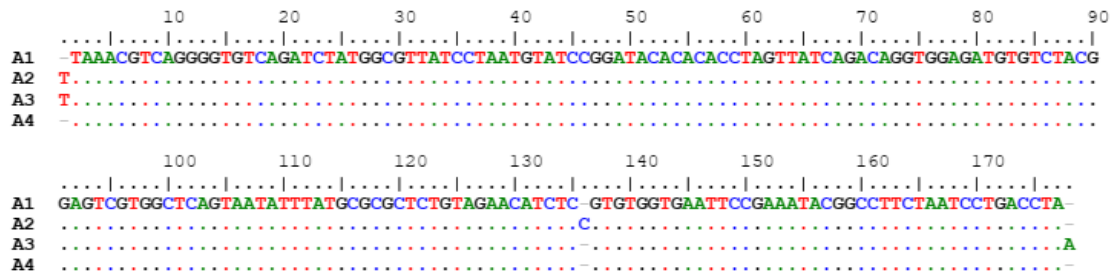
نتایج هم ترازوی توالی های مربوط به ناحیه ژنی *Nad1* توالی های مربوط به سه نمونه A6، A7 و A8 و ۱۰ درصد شبیه هم بودند و تفاوت درون گونه ای در این قسمت از ناحیه ژنی *Nad1* مشاهده نشد (تصویر شماره ۳-۴). دو محصول PCR از این ناحیه ژنی به خوبی توالی یابی نشده بودند.

توالی یابی، هم ترازوی و ترسیم درخت فیلوژنی برای توالی یابی ۱۵ میکرولیتر از ۱۰ محصول PCR با کیفیت (۳ مورد از هر ناحیه ژنی *Nad1* و *ITS2* مربوط به گوسفند و ۲ مورد از هر ناحیه مربوط به بز) همراه با ۱۰ میکرولیتر از پرایمرهای مستقیم و معکوس به شرکت سیناژن ارسال شدند. نمونه ها با تکنیک سانگر (Sanger) (dideoxy technique) در دو جهت مستقیم و معکوس توالی یابی شدند. توالی های مستقیم و معکوس به دست آمده از هر نمونه ابتدا با استفاده از نرم افزار Sequencher با هم یکی شدند. توالی های الحاق شده با استفاده از نرم افزار BioEdit v.7.2.6 تصحیح شدند. برای ردیابی تنوع درون گونه ای، توالی های تصحیح شده با استفاده از الگوریتم ClustalW (۲۳) در نرم افزار MEGA7.0 (۲۴) هم تراز شدند. در مرحله بعد توالی های تصحیح شده با توالی های ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) با روش BLAST مقایسه شدند. برای ارزیابی نهایی تفاوت ها و شباهت ها، تعدادی از توالی های ثبت شده در NCBI انتخاب شدند و با توالی های مطالعه حاضر هم تراز و آنالیز شدند. در نهایت درخت فیلوژنی مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار MEGA7.0 و با روش Neighbor-Joining ترسیم شد.

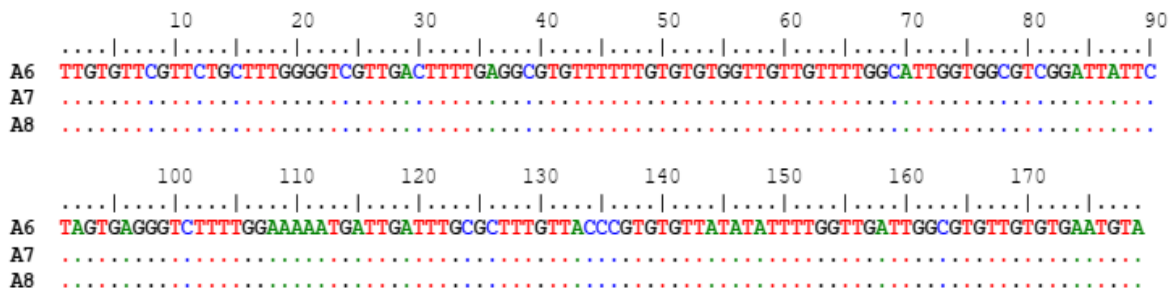
## یافته ها

واکنش PCR برای تکثیر قطعه ۲۰۰ جفت بازی از ژن های *ITS2* و *Nad1* تصاویر شماره ۱-۳ و ۲-۳ باندهای مربوط به قطعات ۲۰۰ جفت بازی تکثیر شده از ژن های *ITS2* و *Nad1* دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از گوسفندها و بزها را به وضوح نشان می دهند.

نتایج هم ترازوی توالی های مربوط به ناحیه ژنی *ITS2* توالی های مربوط به نمونه های A1، A3 و A4 و ۱۰ درصد شبیه هم بودند، ولی توالی مربوط به نمونه A2 (گوسفند) تنها یک نوکلئوتید اضافی در جایگاه ۱۳۶

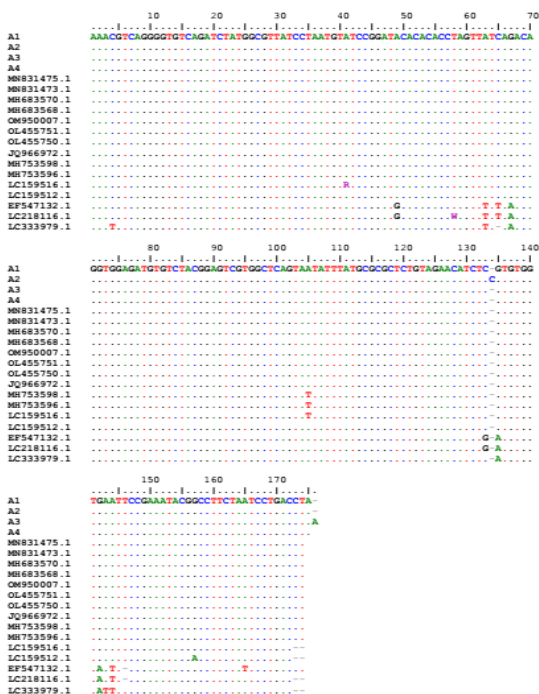


تصویر شماره ۳-۳: هم ترازوی توالی‌های مربوط به ناحیه ژنی ITS2



تصویر شماره ۳-۴: هم ترازوی توالی‌های مربوط به ناحیه ژنی Nad1

۱۰۰ درصدی با سایر توالی‌های انتخاب شده از NCBI نشان دادند.



تصویر شماره ۳-۵: هم ترازوی توالی‌های مربوط به ناحیه ژنی ITS2 با

توالی‌های ثبت شده در NCBI

هم ترازوی توالی‌های مربوط به ناحیه ژنی ITS2 با تعدادی

از توالی‌های ثبت شده در NCBI

به جز سه توالی آخر ( EF547132, LC218116, LC333979

که بیشترین تفاوت‌های درون گونه‌ای را

از خود نشان دادند، سایر توالی‌ها با توالی‌های ناحیه ژنی

ITS2 مربوط به مطالعه حاضر تقریباً ۱۰۰ درصد شباهت

نشان دادند. فقط سه توالی ( MH753598, MH753596, LC159512

در جایگاه نوکلئوتیدی ۱۰۵ به جای A

دارای T بودند (Transversion A↔T). در ضمن، توالی

LC159516 در جایگاه ۴۱ به جای A دارای نوکلئوتید

نامشخص R بود که طبق منابع موثق حرف R به احتمال

قوی می‌تواند A یا G باشد (R=A/G،

Transition A↔G). که در اینجا به احتمال زیاد A

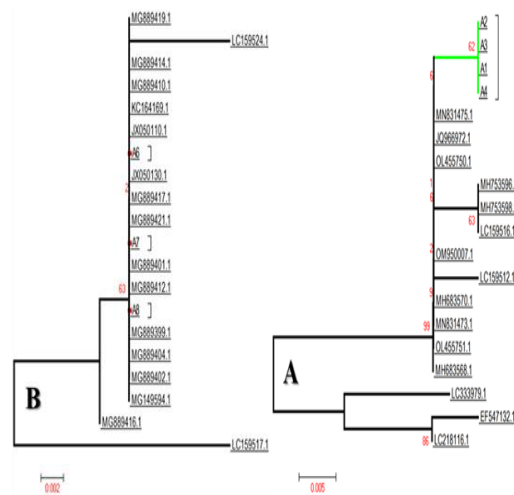
می‌باشد (تصویر شماره ۳-۵).

هم ترازوی توالی‌های مربوط به ناحیه ژنی Nad1 با

تعدادی از توالی‌های ثبت شده در NCBI

توالی‌های ناحیه ژنی Nad1 مطالعه حاضر شباهت

تفاوت در جایگزینی T با C است. سه توالی انتهایی هم بیش‌ترین تفاوت درون گونه‌ای را با سایر توالی‌ها نشان دادند. در درخت فیلوژنی مربوط به *Nad1* سه توالی مطالعه حاضر با فواصل بیشتر از همدیگر و البته به‌طور مشترک با سایر توالی‌های انتخابی از NCBI در یک شاخه مشترک قرار گرفتند. توالی LC159517 متفاوت‌ترین توالی از نظر تنوع درون گروهی می‌باشد. توالی LC159524 دارای چهار باز متفاوت با سایر توالی‌های هم شاخه‌ای بود. توالی MG889416 تنها یک باز T به جای C با سایر توالی‌های مشابه فوقانی بود (تصویر شماره ۳-۶ و A و B).

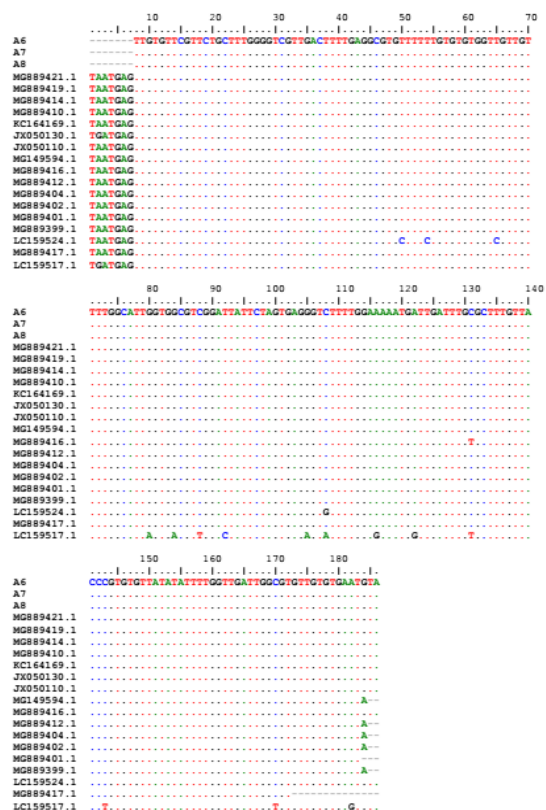


تصویر شماره ۳-۷: درخت فیلوژنی بر اساس توالی‌های مربوط به جایگاه‌های ژنی *ITS2* (A) و *Nad1* (B) با استفاده از روش Neighbor-Joining در نرم‌افزار MEGA7.0. توالی‌های *ITS2* مطالعه حاضر در شاخه سبز و توالی‌های *Nad1* با دایره‌های کوچک مشخص شده‌اند.

## بحث

برای اطلاع از وضعیت اپیدمیولوژی و انتخاب راهبردهای مطلوب کنترل و پیشگیری از آلودگی‌های انگلی، شناسایی دقیق انگل‌ها در هر ناحیه جغرافیایی از اهمیت بالایی برخوردار است (۷). امروزه در بسیاری از علوم زیستی برای دستیابی به نتایج دقیق و معتبر از روش‌های متنوع مولکولی استفاده می‌شود و این

فقط در یک نوکلئوتید با توالی MC889416 در جایگاه ۱۳۱ (Transition C→T) و در چهار نوکلئوتید با توالی LC159524 در جایگاه‌های ۵۰، ۵۴ و ۶۵ (Transition T→C) و (Transversion C→G) ۱۰۸ تفاوت مشاهده شد. توالی LC159517 تفاوت درون گونه‌ای قابل توجهی را با سایر توالی‌ها نشان داد (تصویر شماره ۳-۶).



تصویر شماره ۳-۶: هم‌ترازی توالی‌های مربوط به ناحیه ژنی *Nad1* با توالی‌های ثبت شده در NCBI

ترسیم درخت فیلوژنی بر اساس توالی‌های مربوط به جایگاه‌های ژنی *ITS2* و *Nad1*

در درخت فیلوژنی مربوط به توالی‌های *ITS2*، چهار توالی مطالعه حاضر علاوه بر این که خیلی نزدیک به هم در یک شاخه واحد قرار گرفتند، هم‌چنین به‌طور مشترک با سایر توالی‌های مشابه در یک شاخه واحد دیگر مستقر شدند. جدایی توالی‌های LC159512، MH753598 و MH753596 درون این شاخه به دلیل

روش‌های نوین و دقیق تقریباً در بیشتر موارد جایگزین روش‌های تشخیصی معمول شده‌اند. در روش‌های ارزیابی مولکولی پژوهشگران برای اهداف مطالعاتی خود یا از ژن‌های شناخته شده ریوزومی یا میتوکندریایی استفاده می‌کنند، ولی آن گونه که از نتایج و پیشنهادات اکثر پژوهشگران مشخص است، ژن‌های میتوکندریایی به لحاظ کاربردی و حصول نتیجه بهتر و دقیق‌تر بر ژن‌های ریوزومی ترجیح داده می‌شوند. ژن‌های میتوکندریایی به دلیل هاپلوئید بودن و در نتیجه انجام نشدن تقسیم میتوز، قابلیت بالایی در مطالعات فیلوژنی دارند و جزء کاربردی‌ترین ژن‌ها برای تعیین رابطه فیلوژنی بین گونه‌ها می‌باشند (۲۵). این ژن‌ها در تشخیص گونه‌ها و ترسیم رابطه فیلوژنی دارای مزایایی از جمله تعداد کپی بالاتر در هر سلول، اندازه کوچک‌تر آن، وراثت پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی، وجود نواحی حفاظت شده و نواحی حفاظت نشده برای مطالعات تکاملی گونه‌های خویشاوند می‌باشند (۲۶). به علاوه، ژن‌های میتوکندریایی برهم کنش شناخته شده با محیط ندارند، از این رو به نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی به دست آمده، دقیقاً بازتابی از وجود جدایی تولیدمثلی باشد (۲۷). در ارتباط با ویژگی‌های ریخت‌شناسی گونه‌های دیکروسلیوم اطلاعات اندکی در دسترس است، بنابراین تفاوت‌های درون گونه‌ای و بررسی دقیق جهش‌ها با روش‌های معمول مورفومتریک امکان‌پذیر نیست. از این رو به کارگیری روش‌های مولکولی برای تشخیص هویت انگل‌ها و بررسی تفاوت‌های درون گونه‌ای و بین گونه‌ای با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی معتبر لازم است. توسعه روز افزون بیولوژی مولکولی و ابداع روش‌های حساس و دقیق روش‌های مولکولی برای تکثیر نواحی خاصی از ژنوم انگل، تفاوت‌های آشکاری را در نوع و ترتیب نوکلئوتیدهای گونه‌های مختلف انگلی باعث شده است، به طوری که بر پایه‌ی این تفاوت‌ها می‌توان گونه‌های نزدیک به هم را به راحتی از همدیگر تشخیص داد (۱۰).

تاکنون برای ارزیابی تنوع بین گونه‌ای و درون گونه‌ای دیکروسلیوم از مارکرهای مهم و متنوع ریوزومی و میتوکندریایی در دنیا و ایران استفاده شده است و یافته‌های ژنتیکی ارزشمندی برای گونه‌های شناخته شده دیکروسلیوم در میزبان‌های اهلی و وحشی در مناطق مختلف دنیا به دست آمده است. در مطالعه حاضر توالی‌های ITS2 ریوزومی و Nad1 میتوکندریایی برای شناسایی تنوع درون گونه‌ای دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از گوسفند و بز استفاده شدند. یافته‌های مطالعه حاضر نشان دادند که دیکروسلیوم دندریتیکوم تنها گونه از جنس دیکروسلیوم در بین گوسفندها و بزهای ناحیه مورد مطالعه می‌باشد. آنالیز توالی‌های Nad1 مربوط به این گونه نشان داد که تفاوت ژنتیکی درون گونه‌ای در هیچ کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد و تمام توالی‌ها ۱۰۰ درصد مشابه بودند و به جز سه توالی، با سایر توالی‌های انتخابی ثبت شده در بانک جهانی ژن نیز شباهت ۱۰۰ درصدی را نشان دادند.

مغایر با مطالعه حاضر، گرجی‌پور و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از mtNad1 تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای قابل توجهی (۱۰ هاپلو تایپ) برای نمونه‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم گزارش کرده‌اند ولی تفاوت معنی‌دار درون گونه‌ای را در بین خصوصیات ژنتیکی و مورفولوژیکی در نمونه‌های جدا شده از گاوها و گوسفندهای ایران مشاهده نکردند. در مطالعه مذکور بیش‌ترین پلی‌مورفیسم (۸ جایگاه پلی‌مورفیک) در بین ایزوله‌های D ژن Nad1 (ND-D) گزارش شده است (۵). هم‌چنین، محمدی و همکاران (۲۰۲۱) با استفاده از ناحیه ژنی Nad1، علی‌رغم مشابهت ژنتیکی ۹۹-۹۷ درصدی بین ایزوله‌های دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از گوسفند، بز و گاو، سه هاپلو تایپ برای این گونه گزارش کرده‌اند (۱۹).

مشابه با یافته‌های مطالعه حاضر، شمسی و همکاران (۲۰۲۰) نیز هیچ تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای را در

توالی های *Nad1* در نمونه های دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از گوسفند گزارش نکرده اند (۱۱). هم چنین نظامی و همکاران (۲۰۱۹) علی رغم مشاهده اختلافات مورفومتریک قابل توجه درون گونه ای در ایزوله های دیکروسلیوم دندریتیکوم در گاو، گوسفند و بز، تفاوت خیلی اندکی در توالی های *mtNad1* گزارش کرده اند و حتی مشخص شده است بین توالی های *Nad1* ایزوله های گاو، گوسفند و بز ایرانی با موارد ثبت شده در بانک جهانی ژن تا ۹۹ درصد مشابهت وجود داشته است (۱۰). در چین با بررسی جامع تفاوت درون گونه ای در نمونه های دیکروسلیوم دندریتیکوم بر پایه آنالیز سه ژن میتوکندریایی *pnad1*، *pcytb* و *pcox1* نشان داده شد که بیشترین تفاوت درون گونه ای مربوط به *pnad1* بود (۳). همین طور، با بررسی ناحیه ژنی *Nad1* با استفاده از نمونه های دیکروسلیوم دندریتیکوم با منشاء گاو زرد چینی و بز ژاپنی (*Japanese Serow*) به ترتیب پنج و چهار هاپلوتایپ برای نمونه های چینی و ژاپنی گزارش شده است (۸) به هر حال، علیرغم گزارش تفاوت های درون گونه ای گاهاً قابل توجه و در نتیجه اثبات وجود هاپلوتایپ های متعدد به واسطه آنالیز این مارکر ژنی، جوانمرد و همکاران (۲۰۲۲) اظهار کرده اند برای تشخیص هویت دیکروسلیوم دندریتیکوم، *Nad1* مارکر ژنی مناسبی نیست (۱۷).

در مطالعه حاضر در هم ترازوی توالی های *ITS2* تنها در یک ایزوله گوسفند یک پلی مورفیسم واحد افزایشی (نوکلئوتید  $C_{136}$ ) مشاهده شد، در حالی که سه ایزوله دیگر ۱۰۰ درصد مشابه بودند (دو هاپلوتایپ). گرجی پور و همکاران (۲۰۱۵) نیز در آنالیز توالی های *ITS2* در نمونه های دیکروسلیوم دندریتیکوم جدا شده از گاوها و گوسفندا فقط دو هاپلوتایپ (یک جایگاه پلی مورفیک) را گزارش کرده اند (۰/۴۲- درصد)، به طوری که مشابه با هاپلوتایپ ND-D، هاپلوتایپ *ITS2-A* در ایران غالب بوده و پراکنش وسیعی را نشان داده است (۴). جوانمرد و همکاران (۲۰۲۲) بر پایه ی

آنالیز قطعه *ITS2*، نه هاپلوتایپ واضح در بین ایزوله های دیکروسلیوم دندریتیکوم در گاوها، گوسفندا و بزهای ایران گزارش کرده اند، با این وجود اظهار کرده اند اگر چه *ITS2* یک مارکر ژنی معتبر برای مطالعات کرم های پهن و همین طور قادر به تشخیص تفریقی گونه های دیکروسلیوم می باشد، ولی این قطعه برای بررسی تفاوت های ژنتیکی درون گونه ای مناسب به نظر نمی رسد (۱۷). مشابه با این محققان، Liu و همکاران (۲۰۱۴) اظهار کرده اند توالی های *ITS2* برای تشخیص تفریقی دو گونه دیکروسلیوم دندریتیکوم و دیکروسلیوم چاینسیس به اندازه کافی متمایز بودند ولی تفاوت ها در درون هر گونه خیلی کم بود (۱۵). هم چنین، براساس مطالعه انجام شده در چین برای بررسی اهمیت نقش متغیرهای میزبانی و ناحیه ای، آنالیز فیلوژنی قطعه *ITS2* با وجود تفاوت درون گونه ای ۱/۳ درصدی قادر به تمایز ایزوله های دیکروسلیوم دندریتیکوم نبود. بنابراین نتیجه گیری شده است که این ناحیه ژنی با هدف بررسی ارتباطات فیلوژنی نمونه های دیکروسلیوم دندریتیکوم از جنبه میزبانی و منطقه ای مارکر مناسبی نیست، ولی برای بررسی ارتباطات فیلوژنی گونه های دیکروسلیوم می تواند مارکر مفیدی باشد (۵). Dar و همکاران (۲۰۲۰) و اربابی و همکاران (۲۰۱۲) نیز تفاوت درون گونه ای معنی دار را در بین ایزوله های دیکروسلیوم دندریتیکوم مشاهده نکرده اند (۱۳، ۱۶). صرف نظر از محل و نوع میزبان، تفاوت درون گونه ای در ایزوله های دیکروسلیوم دندریتیکوم در بررسی *Maurelli* و همکاران (۲۰۰۷) کم تر از ۱ درصد (۱) و در مطالعه *Otranto* و همکاران (۲۰۰۷) تقریباً ۱/۳ درصد (۱۲) گزارش شده است.

اطلاعات مولکولی در خصوص گونه های دیکروسلیوم محدود هستند و ژن های در دسترس (مانند *rRNA*، *Cox* و *Nad*) برای جستجوی تفاوت های مولکولی در گونه های دیکروسلیوم از نظر میزبانی و مناطق جغرافیایی مناسب به نظر نمی رسند، ولی خصوصیات مارکرهای ژنتیکی مختلف می توانند

آنالیز قطعه کوتاهی از دو ناحیه ژنی مذکور و تعداد اندک توالی‌یابی باشد. ژن‌های میتوکندریایی برای بررسی هویت ژنتیکی و فیلوژنی انگل‌ها خیلی مطلوب هستند. توالی کامل ژن‌های میتوکندریایی دیکروسلیوم دندریتیوم شامل ۱۴۸۸۴ جفت‌باز است (۱۵). با توجه به تناقض‌های موجود در نتایج اکثر مطالعات که در هر کدام قطعاتی از یک یا دو ژن با طول‌های مختلف آنالیز شده‌اند و در مواردی نتایج سایر مطالعات را به چالش کشیده‌اند، بنابراین پیشنهاد می‌شود یک مطالعه جامع در سطح ملی با آنالیز توالی کامل ژن‌های میتوکندریایی (یا ریپوزومی)، با تعداد زیاد نمونه‌ها از تمام میزبان‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف انجام شود و در این صورت واقعیات موجود آشکار می‌شوند.

### سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح به شماره ۴۳/۱۲۲۶۹/د می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز و نیز از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر مساعدت در تأمین اعتبار مالی و امکانات مورد نیاز در به ثمر رسیدن این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

راهنمایی برای پراکنش ژنتیکی این ترماتود باشند (۱۷). به هر حال، مقادیر اندک تفاوت‌های نوکلئوتیدی درون گونه‌ای در بین ایزوله‌های دیکروسلیوم دندریتیوم، صرف‌نظر از میزبان و محل، یک وابستگی ژنتیکی محدودی را در بین انگل و گونه‌های میزبانی آن نشان می‌دهد. این یافته‌ها یک ثبات ژنتیکی احتمالی در درون جمعیت دیکروسلیوم دندریتیوم محسوب می‌شود، ولی با توجه به این تناقضات در یافته‌ها نمی‌توان رد کرد که تعداد بیش‌تری از ایزوله‌ها از مناطق مختلف و گونه‌های میزبانی متنوع ممکن است الگوی متفاوتی را نشان دهند که در نمونه‌های محدودتر قابل مشاهده نیست (۱۶). لازم به ذکر است که در مواردی تفاوت‌های مورفولوژیکی درون گونه‌ای در ایزوله‌های دیکروسلیوم دندریتیوم گزارش شده است (۱۳) و اظهار شده است که این اختلافات ممکن است مربوط به سن میزبان، شرایط تغذیه‌ای میزبان، شدت آلودگی، شرایط اکولوژیکی و اقلیمی، پراکنندگی جغرافیایی، مرحله رشد انگل، روش اندازه‌گیری، تعداد نمونه، زمان و محل مطالعه باشد (۴). نتایج مطالعه حاضر با قاطعیت نمی‌تواند گویای تمام واقعیات‌ها باشد و این احتمال ممکن است به دلیل

### References

1. Maurelli MP, Rinaldi L, Capuano F, Perugini AG, Veneziano V and Cringoli G. Characterization of the 28S and the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium hospes*. *Parasitol Res* 2007; 101(5): 1251–1255. PMID: 17605007.
2. Addy F, Narh JK, Adjei KK, Adu-Bonsu G. *Dicrocoelium* spp. in cattle from Wa, Ghana: prevalence and phylogeny based on 28S rRNA. *Parasitol Res* 2021; 120(4):1499–1504. PMID: 33594621.
3. Zhao G-H, Bian Q-Q, Ren W-X, Jia Y-Q, Cheng W-Y, Fang Y-Q, Song J-K, Lin Q. Genetic variability among *Dicrocoelium dendriticum* isolates from different regions in Shaanxi Province, China revealed by sequences of three mitochondrial genes. *Mitochondrial DNA* 2013; 24(6): 683–688. PMID: 23521316.
4. orjipoor S, Moazeni M, Sharifiyazdi H. Characterization of *Dicrocoelium dendriticum* haplotypes from sheep and cattle in Iran based on the internal transcribed spacer 2 (ITS-2) and NADH dehydrogenase gene (nad1). *J Helminthol* 2015; 89(2):158–164. PMID: 24119243.
5. Bian Q, Zhao G, Jia Y, Fang Y, Cheng W, Du S et al. Characterization of *Dicrocoelium dendriticum* isolates from small ruminants in

- Shaanxi Province, north-western China, using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *J Helminthol* 2015; 89(1): 124-129. PMID: 23890204.
6. artinez-Ibeas A, Martinez-Valladares M, Gonzalez-Lanza C, Minambres B, Manga-Gonzalez M. Detection of *Dicrocoelium dendriticum* larval stages in mollusc and ant intermediate hosts by PCR, using mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS-2) sequences. *Parasitology* 2011; 138(14): 1916–1923. PMID: 21861946.
  7. Asim Khan M, Afshan K, Nazar M, Firasat S, Chaudhry U, Sargison ND. Molecular confirmation of *Dicrocoelium dendriticum* in the Himalayan ranges of Pakistan. *Parasitol Int* 2021; 81:102276. PMID: 33370606.
  8. Hayashi K, Ohtori M, Tang WQ, Ohari Y, Mohanta UK, Itagaki T. Molecular phylogenetic relationship of *Dicrocoelium dendriticum* from Japan and China based on nucleotide sequences of the mitochondrial nad1. *Jpn J Vet Parasitol* 2016; 15(1):12–18.
  9. Hayashi K, Tang W-Q, Y. Ohari, M. Ohtori, Mohanta UK, Matsuo K, et al. Phylogenetic relationships between *Dicrocoelium chinensis* populations in Japan and China based on mitochondrial nad1 gene sequences. *Parasitol Res* 2017; 116(9): 2605–2609.
  10. Nezami E, Arbabi M, Hooshyar H, Delavari M. Morphological and Molecular Detection of *Dicrocoelium dendriticum* isolated from Domestic Animals Based on Genetic ND1 Marker in Markazi Province. *J Vet Res* 2019; 74(1): 27-34 (persian).
  11. Shamsi L, Tavassoli M, Naem S, Mahmoudian A, Ahmadi E. Morphologic and molecular analysis of *Dicrocoelium dendriticum* species from Iranian native sheep. *J Parasit Dis* 2020; 44(2): 441-446. PMID: 32508420.
  12. Otranto D, Rehbein S, Weigl S, Cantacessi C, Parisi A, Lia RP et al. Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) Tang and Tang, 1978 (platyhelminthes: Digenea). *Acta Trop* 2007; 104(2): 91–98. PMID: 17803950.
  13. Arbabi M, Dalimi-Asl A, Ghaffarifar F, Foorozandeh-Moghadam M. Morphological and molecular characterization of *Dicrocoelium* isolated from sheep in the north and center of Iran. *Feyz* 2012; 16(2): 135–145 (persian).
  14. Bari S, Arbabi M, Gill P, Sharif M, Ziaei Hezarjaribi H, Dodangeh S, et al. Morphological and Molecular (28S rDNA) Characterization of *Dicrocoelium dendriticum* isolates from Sheep, Goat and Cattle in Mazandaran Province, Iran. *J Mazand Univ Med Sci* 2018; 28: 38-45. (Persian).
  15. Liu GH, Yan HB, Otranto D, Wang XY, Zhao GH, Jia WZ et al. *Dicrocoelium chinensis* and *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda: Digenea) are distinct lancet fluke species based on mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 2014; 79: 325–331. PMID: 25016202.
  16. Dar JS, Shabir U, Dar SA, Ganai BA. Molecular characterization and immunodiagnosics of *Dicrocoelium dendriticum* species isolated from sheep of north-west Himalayan region. *J Helminthol* 2020; 94, e174. PMID: 32684172.
  17. Javanmard E, Mohammad Rahimi H, Nemati S, Soleimani Jevinani S, Mirjalali H. Molecular analysis of internal transcribed spacer 2 of *Dicrocoelium dendriticum* isolated from cattle, sheep, and goat in Iran. *BMC Vet Res* 2022; 18(1): 283. PMID: 35864506.

18. Bari S, Sarvi Sh, Daryani A, Ziaeei Hezarjaribi H, Arbabi M, Pirestani M et al. *Dicrocoelium dendriticum* Infection among Domestic Animals in Iran: A systematic Review and Meta-analysis. *J Mazand Univ Med Sci* 2015; 25(132): 362-370. (Persian).
19. Mohammadi F. A survey on prevalence and morphometric and molecular characterization of *Dicrocoelium dendriticum* in ruminants slaughtered in Eslamabad-e Gharb slaughterhouse. *Veterinary Researches & Biological Products* 2021; 34(1): 46-54. (Persian).
20. Ebrahim-Pour MH, Shemshadi B, Bahrami AM, Shirali S. Molecular identification of *Dicrocoelium dendriticum* using (28s rDNA) genomic marker and its histopathologic features in domestic animals in western Iran. *Journal of Basic Research in Medical Sciences* 2020; 7(4): 43-52.
21. Ebrahim-Pour MH, Shemshadi B, Bahrami AM, Shirali S. Morphological and Molecular Characterization of *Dicrocoelium* spp. Isolates from Sheep, Goat and Cattle in the West of Iran. *Egypt J Vet Sci* 2020; 51(3): 321-328.
22. Campos PF, Gilbert TMP. DNA extraction from formalin-fixed material. *Methods Mol Biol* 2012; 840: 81-85. PMID: 22237525.
23. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 1994; 22(22): 4673-4680.
24. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33(7): 1870-1874. PMID: 27004904.
25. Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A. The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Domestic Sheep (*Ovis aries*) and Comparison with the Other Major Ovine Haplotype. *J Mol Evol* 1998; 47(4): 441-448. PMID: 9767689.
26. Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, Valfrè F. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *J Agric Food Chem* 2001; 49(8): 3775-3781. PMID: 11513665.
27. Ovenden JR, Brasher DJ, White RWG. Mitochondrial DNA analyses of the red rock lobster *Jasus edwardsii* supports an apparent absence of population subdivision throughout Australasia. *Mar Biol* 1992; 112: 319-326.