ORIGINAL ARTICLE

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

Abbas Imani Baran[1],
Salar Alidoost[2],
Ahmad Nematollahi[3],
Masoomeh Firouzamandi[4],
Behzad Ghorbanzadeh[5],

[1] Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2] MSc in Veterinary Parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4] Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[5] 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, *Dicrocelium 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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و چهارم شماره ۲۴۶ تیر سال ۱۴۰۴ (۷۱-۶۰)

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

عباس ایمانی باران[۱]
سالار علیدوست[۲]
احمد نعمت الهی[۳]
معصومه فیروز امندی[۴]
بهزاد قربانزاده[۵]

چکیده

سابقه و هدف: *دیکروسلیوم دندریتیکوم* از مهمترین و شایعترین فلوکهای کبدی علفخوارن اهلی و وحشی است. با این وجود، در ارتباط با خصوصیات ژنومی این ترماتود 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 آذربایجانشرقی، از طریق آنالیز ژن‌های میتوکندریائی Nad1 و ریبوزومی 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 بزی (۴ نمونه) برای تعیین توالی ارسال شدند. توالی‌های به‌دست 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 توالی های 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 نمونهٔ گوسفندی مشاهده شد و براساس همین تفاوت فقط دو نوع هاپلوتایپ در بین ایزوله‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* مشاهده شد. آنالیز توالی‌های Nad1 هیچ تفاوت درون گونه‌ای را نشان نداد. در مطالعهٔ حاضر مقایسهٔ توالی‌های ITS2 و Nad1، به‌جز 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 ژن ها 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 ریبوزومی ITS2 استفاده شود.

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

مولف مسئول: عباس ایمانی باران– تبریز: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز **Email**: a.imani@tabrizu.ac.ir
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. دکترای 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

مقدمه

دیکروسلیوم یکی از شایع‌ترین ترماتودهایی است که در مجاری صفراوی و کیسهٔ صفرای طیف وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی و گاهاً انسان ساکن شده و باعث بیماری دیکروسلیازیس می‌شود. از جنس دیکروسلیوم تاکنون پنج گونه شناخته شده است که عمدتاً نشخوارکنندگان را آلوده می‌کنند: *دیکروسلیوم دندریتیکوم*، *دیکروسلیوم هاسپس*، *دیکروسلیوم چاینسیس*، *دیکروسلیوم سوپرری* (مترادف *دیکروسلیوم اورینتالیس*) و *دیکروسلیوم پتروی*. گونه‌های دیکروسلیوم با همپوشانی خیلی کم دارای پراکنش مختلف جهانی هستند، *دیکروسلیوم دندریتیکوم* درآمریکا، آسیا، شمال آفریقا و اروپا، *دیکروسلیوم هاسپس* عمدتاً در آفریقا، *دیکروسلیوم چاینسیس* در آسیا، و *دیکروسلیوم سوپرری* دراتحادجماهیر شوروی قدیم واتریش یافت می‌شوند(۱، ۲).

به‌طور کلی، تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای برای دیکروسلیوم شایع است و این موضوع کنترل دیکروسلیازیس در حیوانات را با مشکل مواجه می‌سازد (۳). کرم‌های دارای مورفولوژی مشابه تفاوت‌های قابل توجهی را در عوامل مهم اپیدمیولوژیکی مانند عفونت‌زایی، بیماری‌زایی، آنتی‌ژنیسیتی و حساسیت در برابر ضد انگل‌ها نشان می‌دهند (۴). مطالعات نشان داده‌اند روش‌های تشخیصی مورفولوژیکی معمول صرفاً بر روی کرم بالغ یا تخم استوارند، بنابراین توانایی تشخیص تفاوت بین گونه‌ای گونه‌های دیکروسلیوم و همین‌طور تفاوت‌های درون گونه‌ای یا درون جمعیتی گونه‌ی مهمی چون *دیکروسلیوم دندریتیکوم* را ندارند. بنابراین، امروزه روش‌های مولکولی، به‌عنوان یک روش ایده‌آل برای تمایز بین ایزوله‌های انگل و آشکار ساختن تغییرات ژنتیکی انگل‌ها با استفاده از توالی‌های DNA ریبوزومی (rDNA) و DNA میتوکندریائی (mtDNA)، این مشکل را مرتفع می‌سازند (۵-۳). تاکنون مطالعات زیادی برپایه‌ی ریخت‌شناسی و مولکولی برای تشخیص تفریقی گونه‌های دیکروسلیوم و همچنین تعیین تنوع ژنتیکی و وجود تفاوت‌های درون گونه‌ای در برخی گونه‌های دیکروسلیوم، به‌ویژه *دیکروسلیوم دندریتیکوم*، با استفاده از توالی‌های rDNA و mtDNA انجام شده است(۱، ۴). بنابر اظهارات محققان، ژن‌های میتوکندریایی در مقایسه با ژن‌های ریبوزومی برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی بین افراد یا جمعیت‌های موجود در گونه‌های نماتود، ترماتود و سستود، به‌دلیل وراثت مادری، تکامل سریع و میزان جهش بیش‌تر در این ژن‌ها، مناسب‌تر هستند(۳). صرف‌نظر از این برتری بیان شده، مطالعات متعددی با استفاده از ژن‌های میتوکندریائی Cox1 (۳، ۶، ۷)، Nad1 (۳، ۴، ۸-۱۱) و Cytb (۳)؛ و ژن‌های ریبوزومی 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 گونه‌های دیکروسلیوم و تعیین تنوع درون گونه‌ای استفاده شده‌اند.

به‌علت ماهیت زئونوتیک *دیکروسلیوم دندریتیکوم* و خسارات اقتصادی قابل توجه ناشی از آلودگی با این ترماتود، اطلاع از وضعیت اپیدمیولوژی دیکروسلیازیس درجوامع انسانی و دامی حائز اهمیت است. تمامی مطالعات انجام شده در ایران نشان داده‌اند *دیکروسلیوم دندریتیکوم* تنها گونهٔ عامل دیکروسلیازیس در دام‌های اهلی می‌باشد. طبق بررسی‌ها در ایران، درصد شیوع نسبی دیکروسلیازیس ناشی از این گونهٔ مهم در بین گوسفندان ۳/۱ درصد (۴/۲-۲/۲)، 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 سال‌های اخیر در ایران بررسی‌هایی 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 تفاوت‌های درون گونه‌ای در نمونه‌های جدا شده از گوسفندها و بزهای کشتار شده در کشتارگاه‌های شهرستان‌های استان آذربایجانشرقی، با روش مولتی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

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 کیسهٔ صفرا بازرسی شده و کبدهای آلوده به *دیکروسلیوم دندریتیکوم* 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 به‌مدت دو ساعت در آب نمک رقیق قرار گرفتند. با استفاده از تیغهٔ اسکالپل، قیچی و پنس تمام مجاری موجود در کبد باز شده و تمام کرم‌های بالغ *دیکروسلیوم دندریتیکوم* 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 قطعهٔ تقریبی ۲۰۰ جفت باز از دو ژن Nad1 (Nad1F: 5'-GAGAGTTTCACTGTGCAG-3' و Nad1R: 5'-TTTAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3') و ITS2 (ITS2F: 5'-GTCCCCACTCGCTGAGGTATT-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 نمونهٔ 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)، برنامهٔ زمانی واکنش PCR برای تکثیر قطعهٔ 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. برنامهٔ زمانی و شرایط دمایی برای تکثیر قطعهٔ ITS2 مشابه با شرایط تکثیر قطعهٔ Nad1 بود، با این تفاوت که تعداد چرخهٔ مرحلهٔ دوم شامل ۳۰ چرخه و مدت زمان برای هرمرحلهٔ 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 مشاهدهٔ 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

توالی یابی، هم ترازی و ترسیم درخت فیلوژنی

برای توالی‌یابی ۱۵ میکرولیتر از ۱۰ محصول PCR باکیفیت (۳ مورد از هر ناحیهٔ ژنی Nad1 و ITS2 مربوط به گوسفند و ۲ مورد از هر ناحیهٔ مربوط به بز) همراه با ۱۰ میکرولیتر از پرایمرهای مستقیم و معکوس به شرکت سیناژن ارسال شدند. نمونه‌ها با تکنیک سانگر (Sanger dideoxy technique) در دو جهت مستقیم و معکوس توالی‌یابی شدند. توالی‌های مستقیم و معکوس به‌دست آمده از هر نمونه ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Sequencher با هم یکی شدند. توالی‌های الحاق شده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit v.7.2.6 تصحیح شدند. برای ردیابی تنوع درون گونه‌ای، توالی‌های تصحیح شده با استفاده از الگوریتم ClustalW(۲۳) در نرم‌افزار MEGA7.0 (۲۴) هم تراز شدند. در مرحلهٔ بعد توالی‌های تصحیح شده با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) با روش BLAST، مقایسه شدند. برای ارزیابی نهایی تفاوت‌ها و شباهت‌ها، تعدادی از توالی‌های ثبت شده در NCBI انتخاب شدند و با توالی‌های مطالعهٔ حاضر هم تراز و آنالیز شدند. در نهایت درخت فیلوژنی مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA7.0 و با روش Neighbor-Joining ترسیم شد.

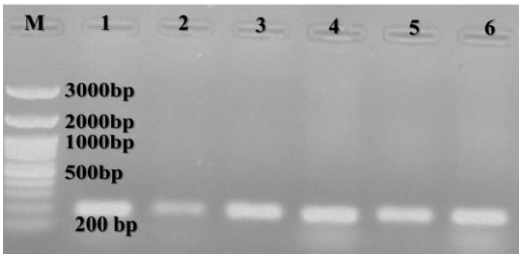
یافته‌ها

واکنش PCR برای تکثیر قطعهٔ ۲۰۰ جفت‌بازی از ژن‌های Nad1 و ITS2

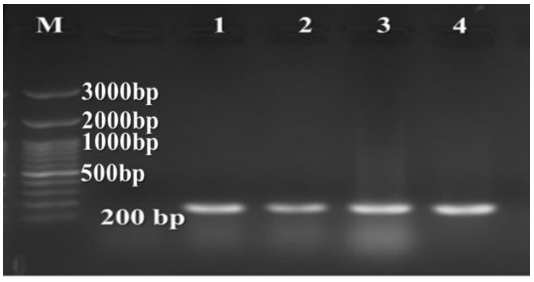
تصاویر شماره ۳-۱ و ۳-۲ باندهای مربوط به قطعات ۲۰۰ جفت‌بازی تکثیر شده از ژن‌های ITS2 و Nad1 *دیکروسلیوم دندریتیکوم* جدا شده از گوسفندها و بزها را به‌وضوح نشان می‌دهند.

نتایج هم‌ترازی توالی‌های مربوط به ناحیهٔ ژنی ITS2

توالی‌های مربوط به نمونه‌های A1، A3 و A4 ۱۰۰ درصد شبیه هم بودند، ولی توالی مربوط به نمونهٔ A2 (گوسفند) تنها یک نوکلئوتید اضافی در جایگاه ۱۳۶ (C_{136} Indel) داشت که در توالی‌های مربوط به سه نمونهٔ دیگر مشاهده نشد (تصویر شماره ۳-۳).



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



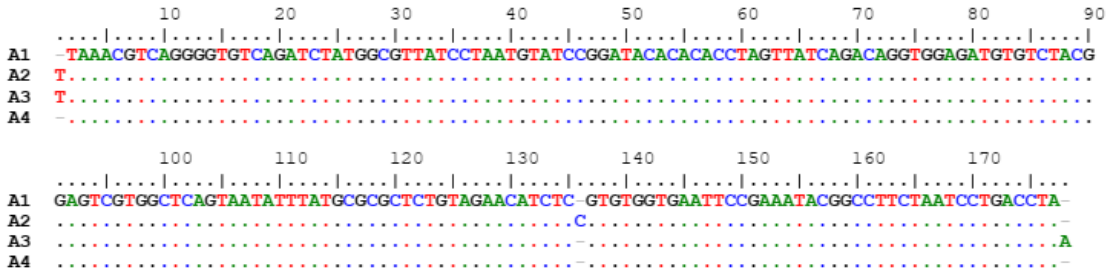
تصویر شماره ۳-۲: الکتروفورز محصولات PCR قطعهٔ 200bp از ژن Nad1 *دیکروسلیوم دندریتیکوم* جدا شده از گوسفند و بز.
M: مارکر 100bp؛ ۲-۱: نمونه‌های بز؛ ٤-۳: نمونه‌های گوسفند

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

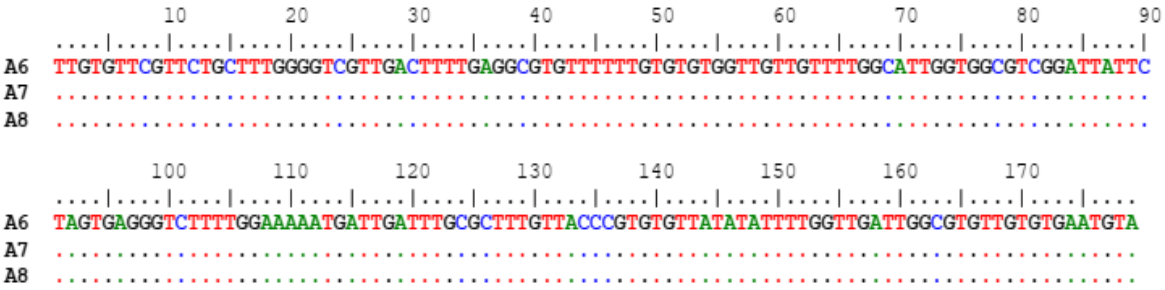
نتایج هم ترازی توالی‌های مربوط به ناحیهٔ ژنی Nad1

توالی‌های مربوط به سه نمونهٔ A6، A7 و A8 ۱۰۰ درصد شبیه هم بودند و تفاوت درون گونه‌ای در این قسمت از ناحیهٔ ژنی Nad1 مشاهده نشد (تصویر شماره ۳-۴). دو محصول PCR از این ناحیهٔ ژنی به‌خوبی توالی‌یابی نشده بودند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]



تصویر شماره ۳-۳: هم ترازی توالی‌های مربوط به ناحیهٔ ژنی ITS2



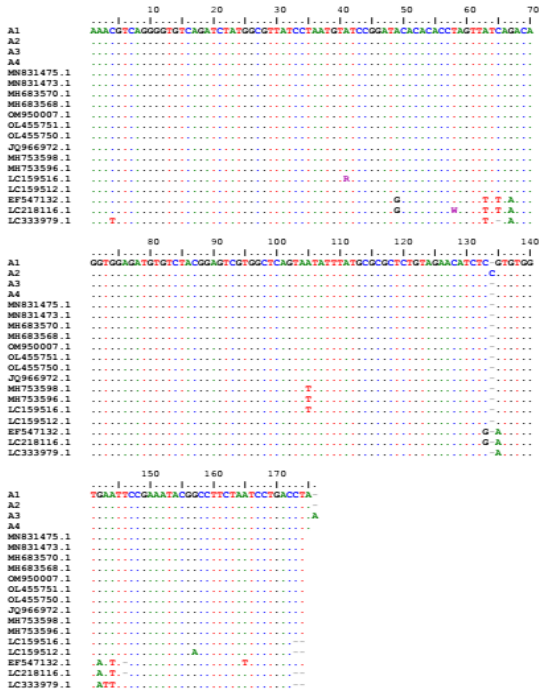
تصویر شماره ۳-٤: هم ترازی توالی‌های مربوط به ناحیهٔ ژنی Nad1

هم‌ترازی توالی‌های مربوط به ناحیهٔ 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 ناحیهٔ ژنی ITS2 مربوط به مطالعهٔ حاضر تقریباً ۱۰۰ درصد شباهت نشان دادند. فقط سه‌توالی (MH753598, MH753596, LC159512) در جایگاه نوکلئوتیدی ۱۰۵ به جای A دارای T بودند (Transversion A↔T). در ضمن، توالی LC159516 درجایگاه 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، TransitionA↔G). که در اینجا به احتمال زیاد A می‌باشد (تصویر شماره ۳-۵).

هم‌ترازی توالی‌های مربوط به ناحیهٔ ژنی Nad1 با تعدادی از توالی‌های ثبت شده در NCBI

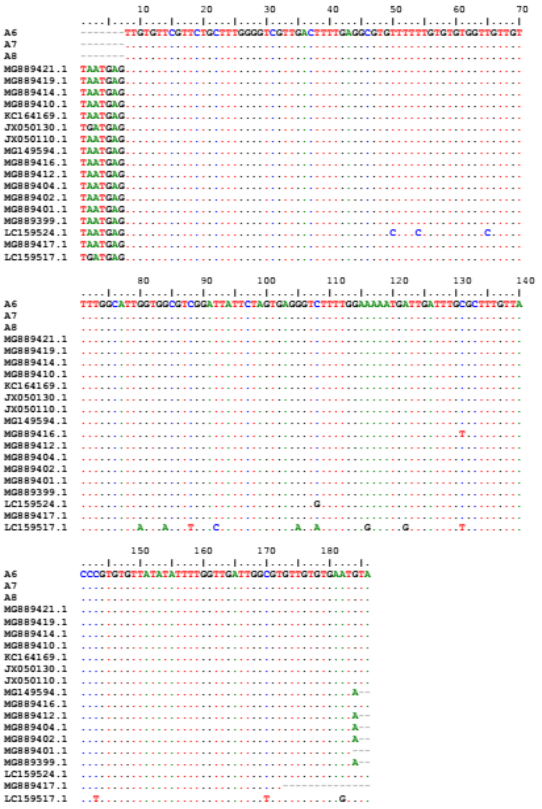
توالی‌های ناحیهٔ ژنی Nad1 مطالعهٔ حاضر شباهت ۱۰۰ درصدی با سایر توالی‌های انتخاب شده از NCBI نشان دادند.



تصویر شماره ۳-۵: هم ترازی توالی‌های مربوط به ناحیهٔ ژنی ITS2 با توالی‌های ثبت شده در NCBI

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

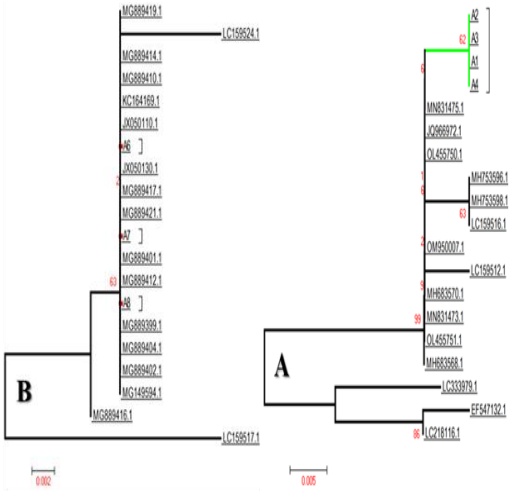
فقط در یک نوکلئوتید با توالی MC889416 در جایگاه ۱۳۱ (Transition C↔T) و در چهار نوکلئوتید با توالی LC159524 در جایگاه‌های ۵۰، ۵۴ و ۶۵ (Transition T↔C) و ۱۰۸ (Transversion C↔G) تفاوت مشاهده شد. توالی LC159517 تفاوت درون گونه‌ای قابل توجهی را با سایر توالی‌ها نشان داد (تصویر شماره ۳-۶).



تصویر شماره ۳-۶: هم ترازی توالی‌های مربوط به ناحیهٔ ژنی Nad1 با توالی‌های ثبت شده در NCBI

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

در درخت فیلوژنی مربوط به توالی‌های ITS2، چهار توالی مطالعهٔ حاضر علاوه بر این که خیلی نزدیک به‌هم در یک شاخهٔ واحد قرار گرفتند، هم‌چنین به‌طور مشترک با سایر توالی‌های مشابه در یک شاخهٔ واحد دیگر مستقر شدند. جدایی توالی‌های LC159512، MH753596 و MH753598 درون این شاخه به‌دلیل 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 سه‌توالی مطالعهٔ حاضر با فواصل بیشتر از همدیگر و البته به‌طور مشترک با سایر توالی‌های انتخابی از NCBI در یک شاخهٔ 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 ۳-۷: 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 مطالعهٔ حاضر در شاخهٔ 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 ناحیهٔ 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

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 شدهٔ ریبوزومی 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 ژن های ریبوزومی 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 رابطهٔ فیلوژنی بین گونه‌ها می‌باشند(۲۵). این ژن‌ها در تشخیص گونه‌ها و ترسیم رابطهٔ فیلوژنی دارای مزایایی از جمله تعداد کپی بالاتر در هر سلول، اندازهٔ کوچک‌تر آن، وراثت‌پذیری مادری، هاپلوئید بودن، عدم وجود نوترکیبی، وجود نواحی حفاظت شده و نواحی حفاظت نشده برای مطالعات تکاملی گونه‌های خویشاوند می‌باشند(۲۶). به‌علاوه، ژن‌های میتوکندریایی برهم کنش شناخته شده با محیط ندارند، از این‌رو به نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی به‌دست 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 به‌کارگیری روش‌های مولکولی برای تشخیص هویت انگل‌ها و بررسی تفاوت‌های درون گونه‌ای و بین گونه‌ای با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی معتبر لازم است. توسعهٔ 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، به‌طوری که بر پایه‌ی این تفاوت‌ها می‌توان گونه‌های نزدیک به هم را به‌راحتی از همدیگر تشخیص داد(۱۰).

تاکنون برای ارزیابی تنوع بین گونه‌ای و درون گونه‌ای دیکروسلیوم از مارکرهای مهم و متنوع ریبوزومی 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 به‌دست آمده است. در مطالعهٔ حاضر توالی‌های ITS2 ریبوزومی و Nad1 میتوکندریایی برای شناسایی تنوع درون گونه‌ای *دیکروسلیوم دندریتیکوم* جدا شده از گوسفند و بز استفاده شدند. یافته‌های مطالعهٔ حاضر نشان دادند که *دیکروسلیوم دندریتیکوم* تنها گونه از جنس دیکروسلیوم در بین گوسفندها و بزهای ناحیهٔ 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 مطالعهٔ حاضر، گرجی‌پور و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از mtNad1 تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای قابل توجهی (۱۰ هاپلوتایپ) 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 مطالعهٔ 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 ناحیهٔ ژنی Nad1، علی‌رغم مشابهت ژنتیکی ۹۹-۹۷ درصدی بین ایزوله‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* جدا شده از گوسفند، بز و گاو، سه هاپلوتایپ برای این گونه گزارش کرده اند(۱۹).

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

توالی‌های Nad1 در نمونه‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* جدا شده از گوسفند گزارش نکرده‌اند(۱۱). هم‌چنین نظامی و همکاران (۲۰۱۹) علی‌رغم مشاهدهٔ اختلافات مورفومتریک قابل توجه درون گونه‌ای در ایزوله‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* در گاو، گوسفند و بز، تفاوت خیلی اندکی در توالی‌های mtNad1 گزارش کرده‌اند و حتی مشخص شده است بین توالی‌های Nad1 ایزوله‌های 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 گونه‌ای در نمونه‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* برپایهٔ آنالیز سه ژن میتوکندریایی p*nad1*، p*cytb* و p*cox1* نشان داده شد که بیش‌ترین تفاوت درون گونه‌ای مربوط به p*nad1* بود(۳). همین‌طور، با بررسی ناحیهٔ ژنی Nad1 با استفاده از نمونه‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* با منشاء گاو زرد چینی و بز ژاپنی (Japanese Serow) به‌ترتیب پنج و چهار هاپلوتایپ برای نمونه‌های چینی و ژاپنی گزارش شده است(۸) به هر حال، علیرغم گزارش تفاوت‌های درون گونه‌ای گاهاً قابل توجه و در نتیجه اثبات وجود هاپلوتایپ‌های متعدد به‌واسطهٔ آنالیز این مارکر ژنی، جوانمرد و همکاران (۲۰۲۲) اظهار کرده‌اند برای تشخیص هویت *دیکروسلیوم دندریتیکوم*، Nad1 مارکر ژنی مناسبی نیست(۱۷).

در مطالعهٔ حاضر در هم ترازی توالی‌های ITS2 تنها در یک ایزولهٔ گوسفند یک پلی‌مورفیسم واحد افزایشی (نوکلئوتید C_{136}) مشاهده شد، در حالی که سه ایزولهٔ دیگر ۱۰۰ درصد مشابه بودند (دو هاپلوتایپ). گرجی‌پور و همکاران (۲۰۱۵) نیز در آنالیز توالی‌های ITS2 در نمونه‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* جدا شده از گاوها و گوسفندها فقط دو هاپلوتایپ (یک جایگاه پلی‌مورفیک) را گزارش کرده‌اند (۰/۴۲-۰ درصد)، به‌طوری 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 پایه‌ی آنالیز قطعهٔ ITS2، نه هاپلوتایپ واضح در بین ایزوله‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* در گاوها، گوسفندها و بزهای ایران گزارش کرده‌اند، با این وجود اظهار کرده‌اند اگر چه ITS2 یک مارکر ژنی معتبر برای مطالعات کرم‌های پهن و همین‌طور قادر به تشخیص تفریقی گونه‌های دیکروسلیوم می‌باشد، ولی این قطعه برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی درون گونه‌ای مناسب به‌نظر نمی‌رسد(۱۷). مشابه با این محققان، Liu و همکاران (۲۰۱۴) اظهار کرده‌اند توالی‌های ITS2 برای تشخیص تفریقی دو گونهٔ *دیکروسلیوم دندریتیکوم* و *دیکروسلیوم چاینسیس* به اندازهٔ کافی متمایز بودند ولی تفاوت‌ها در درون هرگونه خیلی کم بود(۱۵). هم‌چنین، براساس مطالعهٔ انجام شده در چین برای بررسی اهمیت نقش متغیرهای میزبانی و ناحیه‌ای، آنالیز فیلوژنی قطعهٔ ITS2 با وجود تفاوت درون گونه‌ای ۱/۳ درصدی قادر به تمایز ایزوله‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* نبود. بنابراین نتیجه‌گیری شده است که این ناحیهٔ ژنی با هدف بررسی ارتباطات فیلوژنی نمونه‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* از جنبهٔ میزبانی و منطقه‌ای مارکر مناسبی نیست، ولی برای بررسی ارتباطات فیلوژنی گونه‌های دیکروسلیوم می‌تواند مارکر مفیدی باشد(۵). Dar و همکاران (۲۰۲۰) و اربابی و همکاران (۲۰۱۲) نیز تفاوت درون گونه‌ای معنی‌دار را در بین ایزوله‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* مشاهده نکرده‌اند(۱۳، ۱۶). صرف‌نظر از محل و نوع میزبان، تفاوت درون گونه‌ای در ایزوله‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* در بررسی Maurelli و همکاران (۲۰۰۷) کم‌تر از ۱ درصد(۱) و در مطالعهٔ Otranto و همکاران (۲۰۰۷) تقریباً ۱/۳ درصد(۱۲) گزارش شده است.

اطلاعات مولکولی در خصوص گونه‌های دیکروسلیوم محدود هستند و ژن‌های در دسترس (مانند rRNA، Cox و Nad) برای جستجوی تفاوت‌های مولکولی در گونه‌های دیکروسلیوم از نظر میزبانی و مناطق جغرافیایی مناسب به‌نظر نمی‌رسند، ولی خصوصیات مارکرهای ژنتیکی مختلف می‌توانند

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

راهنمایی برای پراکنش ژنتیکی این ترماتود باشند(۱۷). به هر حال، مقادیر اندک تفاوت‌های نوکلئوتیدی درون گونه‌ای در بین ایزوله‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم*، 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 دندریتیکوم* 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 به‌ذکر است که در مواردی تفاوت‌های مورفولوژیکی درون گونه‌ای در ایزوله‌های *دیکروسلیوم دندریتیکوم* 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، پراکندگی جغرافیایی، مرحلهٔ رشد انگل، روش اندازه‌گیری، تعداد نمونه، زمان و محل مطالعه باشد(۴).

نتایج مطالعهٔ حاضر با قاطعیت نمی‌تواند گویای تمام واقعیت‌ها باشد و این احتمال ممکن است به دلیل آنالیز قطعهٔ کوتاهی از دو ناحیهٔ ژنی مذکور و تعداد اندک توالی‌یابی باشد. ژن‌های میتوکندریایی برای بررسی هویت ژنتیکی و فیلوژنی انگل‌ها خیلی مطلوب هستند. توالی کامل ژن‌های میتوکندریایی *دیکروسلیوم دندریتیکوم* 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 درمواردی نتایج سایر مطالعات را به چالش کشیده‌اند، بنابراین پیشنهاد می‌شود یک مطالعهٔ جامع در سطح ملی با آنالیز توالی کامل ژن‌های میتوکندریایی (یا ریبوزومی)، 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 به‌شمارهٔ ۴۳/۱۲۲۶۹/د می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تبریز و نیز از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به‌خاطر مساعدت در تأمین اعتبار مالی و امکانات مورد نیاز در به ثمر رسیدن این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

Shaanxi Province, north-western China, using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. J Helminthol 2015; 89(1): 124-129. PMID: 23890204.

6. artınez-Ibeas A, Martınez-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 immunodiagnostics 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]

18. Bari S, Sarvi Sh, Daryani A, Ziaeei Hezarjaribi H, Arbabi M, Pirestani M et al. Dicrocoelium dentriticum 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-29]