

بررسی تنوع ژنتیکی در درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره

محمد حسین بنابازی^۱، سعید اسماعیل خانیان^۲، سیدرضا میرانی آشتیانی^۱ و محمد مرادی شهربابک^۱

چکیده

در مطالعه حاضر تنوع ژنتیکی درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی (سنجایی، کردی کردستان، کردی خراسان، مهربان و مغانی) با استفاده از شش جفت آغازگر ریزماهواره‌ای (McMA2، McMA26، MAF64، OarCP26، OarAE64 و OarFCB304) بررسی گردید. واکنش‌های PCR با تمام آغازگرها بجز OarAE64 به خوبی انجام گردید. تمامی جایگاه‌ها در همه جمعیت‌ها چند شکل بودند. سه آلل اختصاصی در دو جایگاه برای جمعیت کردی خراسان به دست آمد ولی فراوانی قابل ملاحظه‌ای نداشتند. به جز جمعیت مغانی برای جایگاه McMA2، تمامی جمعیت‌های مورد مطالعه در جایگاه‌های ریزماهواره‌ای مورد بررسی در تعادل هاردی-واینبرگ بودند ($P < 0/005$). کمترین و بیشترین فاصله ژنتیکی D_A به ترتیب بین جمعیت‌های کردی کردستان و کردی خراسان (0/234) و بین سنجایی و مغانی (0/388) به دست آمد. در گروه‌بندی جمعیت‌ها بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی D_A ، که با دو روش پیوند همجواری (NJ) و روش جفت گروهی غیر وزنی از طریق میانگین حسابی (UPGMA) انجام شد، دو جمعیت کردی خراسان و کردی کردستان با هم و سپس سنجایی با آنها در یک گروه قرار گرفت و جمعیت مهربان و مغانی یک گروه مجزا تشکیل دادند. بیشترین و کمترین تنوع درون جمعیتی، که برای هر جمعیت به صورت متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار در همه جایگاه‌ها برآورد گردید، بترتیب مربوط به جمعیت‌های مهربان (0/847) و کردی خراسان (0/744) بود. هم‌چنین زمان انشقاق بین دو جمعیت کردی 445 سال به دست آمد که با شواهد تاریخی همخوانی دارد.

واژه‌های کلیدی: گوسفندان ایرانی، نشانگرهای ریزماهواره، تنوع ژنتیکی، هتروزیگوسیتی، چند شکلی

مقدمه

ناپذیرند (V). در سال‌های اخیر، نشانگرهای ژنتیکی و به‌ویژه نشانگرهای DNA به یاری متخصصین مربوطه آمده و به ابزاری قابل اعتماد و مناسب جهت مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی و مطالعات ژنتیک جمعیت تبدیل گردیدند. در این میان

در طی دهه ۸۰ میلادی، بر اهمیت منابع ژنتیکی حیوانی از لحاظ دام‌پروری و تولید غذا به طور فزاینده‌ای تأکید شد و مشخص شد که استفاده و حفظ این منابع دو مقوله تفکیک

۱. به ترتیب کارشناس ارشد و دانشیاران علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۲. استادیار بخش بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج

جدول ۱. مشخصات جایگاه‌های مورد مطالعه

نام جایگاه و موقعیت کروموزومی*	آغازگرها (5'-3')	واحد تکرار شونده	شماره دسترسی**	ماخذ
McMA2 (13)	TCACCCAACAATCATGAAAC TTAAATCGAGTGTGAATGGG	(AC) ₂₈	AF098773	۱۹
McMA26 (18)	TCTCTGCTTTCCAGCCTTATTC AGAGCTTTTAGGACAGCCACC	(GT) ₃₁	AF098961	۱۹
MAF64 (1)	AATAGACCATTCAGAGAAACGTTGAC CTCATGGAATCAGACAAAAGGTAGC	(TG) ₁₃	M62993	۲۸
OarCP26 (4)	GGCCTAACAGAATTCAGATGATGTTGC GTCACCATACTGACGGCTGGTTCC	(CA) ₁₁ CG(CA) ₁₅	U15698	۱۴
OarAE64 (7)	TGCAAGAAGGCGAGACCTTGGAG CAGACCACTCTCTCCCTCCACG	(AC) ₂₄	L13869	۱۵
OarFCB304 (19)	CCCTAGGAGCTTTCAATAAGAATCGG CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	(TC) ₆ GC [(TC) ₄ GC] ₂ (TC) ₁₁ (AC) ₁₅	L01535	۸

*: اعداد داخل پرانتز شماره کروموزومی است که ریزماهوره مربوطه روی آن واقع است

** : این شماره ها کد دسترسی به هر یک از این ریزماهوره ها در بانک ژن NCBI با آدرس اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/viewer.cgi> می باشد.

گوسفند استفاده گردید. سپس با فرض این که این دو جمعیت حدود ۴۰۰ سال پیش از هم انشقاق یافته اند، ضرایب α برای هر یک از جایگاه‌های ریزماهوره‌ای مورد مطالعه محاسبه گردید.

نتایج و بحث

واکنش‌های PCR با تمام آغازگرها به جز OarAE64 به خوبی انجام گردید (شکل ۱).

سه آلل اختصاصی در دو جایگاه برای جمعیت کردی خراسان به دست آمد ولی فراوانی قابل ملاحظه‌ای نداشتند. مقایسه تعداد، نوع و دامنه اندازه آلل‌های حاصل از مطالعه حاضر با مطالعات دیگران (۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۹، ۲۰، ۲۶ و ۲۹) نشان می‌دهد که گوسفندان ایرانی آلل‌های جدیدی را در جایگاه‌های مورد مطالعه دارا می‌باشند و برخی از آلل‌هایی که در مطالعات مذکور گزارش شده بودند در جمعیت‌های مورد مطالعه دیده نشد. تنها جمعیت مغانی برای جایگاه ۲ McMA از تعادل انحراف نشان داد ($P < 0.005$).

جدول ۲، ماتریس‌های فواصل ژنتیکی به دست آمده را برای هر دو معیار مورد نظر نشان می‌دهد. روند کم و بیش مشابهی در هر دو ماتریس به چشم می‌خورد. تاکزاکمی و نی (۳۰)

نمونه‌ها ترسیم گردید. تنوع درون جمعیتی به صورت متوسط هتروزایگوستی مورد انتظار ناآریب (۲۳) با نرم افزار POPTREE برآورد گردید. معیارهای چند شکلی از جمله تعداد آلل مشاهده شده و تعداد آلل مؤثر (The Number of Effective Alleles) (۱۸) با نرم افزار POPGENE و محتوای اطلاعات چند شکلی (Polymorphic Information Content) (PIC) (۹) با نرم افزار HET (۲۵) محاسبه گردید.

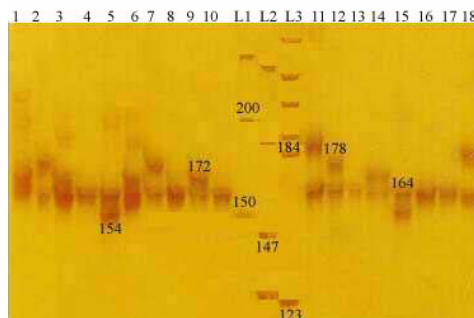
با فرض هم منشاء بودن دو جمعیت کردی کردستان و کردی خراسان و با استفاده از فاصله استاندارد ناآریب Nei (۲۳)، زمان انشقاق (Divergence Time) این دو جمعیت با استفاده از فرمول زیر (۱۰) برآورد گردید و با سابقه تاریخی موجود (۲) مقایسه شد:

$$\hat{D} = 2\alpha t$$

که در آن \hat{D} فاصله ژنتیکی استاندارد ناآریب t ، تعداد نسل‌هایی که از زمان انشقاق دو جمعیت گذشته است و α نرخ تغییر تعداد تکرار ریزماهوره‌ها می‌باشد. در انسان 4×10^{-5} جهش خودبه‌خودی به‌ازای هر جایگاه در هر گامت مشاهده شده است. در برآورد زمان انشقاق دو جمعیت کردی کردستان و کردی خراسان نیز از این α و فرض فاصله نسلی $3/5$ سال برای

جدول ۲. ماتریس فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه. اعداد بالای قطر فواصل ژنتیکی استاندارد Nei (D_S) و اعداد زیر قطر فواصل ژنتیکی D_A می‌باشند. این ماتریس‌ها با ۱۰۰۰ بار جایگذاری نمونه‌ها به دست آمد.

مغانی	مهربان	کردی خراسان	کردی کردستان	سنجابی
۰/۵۵۹	۰/۱۸۰	۰/۴۵۰	۰/۱۸۰	سنجابی
۰/۴۶۷	۰/۳۴۷	۰/۲۷۱	_____	کردی کردستان
۰/۴۹۸	۰/۳۹۵	_____	۰/۲۳۴	کردی خراسان
۰/۲۹۳	_____	۰/۳۵۳	۰/۳۰۴	مهربان
_____	۰/۲۶۰	۰/۳۷۱	۰/۳۷۱	مغانی

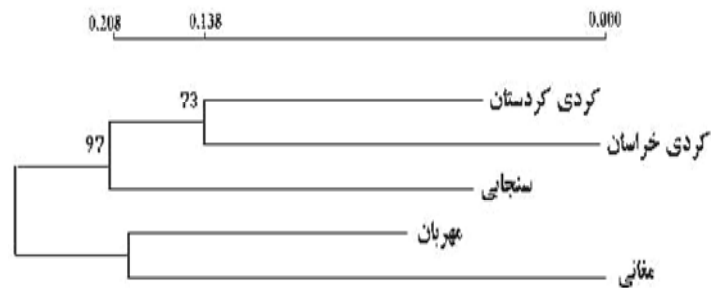


شکل ۱. الگوی بانندی جایگاه OarFCB304 در جمعیت کردی خراسان. شماره‌های ۱ تا ۱۸ افرادی از جمعیت کردی خراسان و L1، L2 و L3 به ترتیب نشانگرهای اندازه شماره XIII، VIII و V شرکت Roche آلمان می‌باشند.

کردستان و مغانی ($D_S=0/467$ و $D_A=0/371$) می‌باشد. از آنجایی که در پیش فرض‌های اولیه جمعیت مغانی، به واسطه فاصله جغرافیایی زیاد بین محل پراکنش آن یعنی استان اردبیل با گوسفندان ناحیه غرب کشور و وجود موانع جغرافیایی عمده مانند دریای خزر و کوهستان میان استان‌های اردبیل و خراسان که امکان تبادل ژنتیکی طبیعی این جمعیت را با سایر جمعیت‌های مورد مطالعه محدود می‌سازد، به‌عنوان یک گروه جدا (Outgroup) در نظر گرفته شده است، انتظار می‌رود که در یک سوی فواصل حداکثر این جمعیت قرار داشته باشد. تفاوت‌های فنوتیپی آشکار آن با سایر جمعیت‌های مورد مطالعه نیز این امر را تأیید می‌نماید. یکی از دلایل احتمالی فاصله ژنتیکی متوسط بین مغانی و مهربان ($D_S=0/293$ و $D_A=0/260$) می‌تواند این باشد که قوچ‌های مهربان به علت فنوتیپ گوشتی مناسبی که دارند، در طول سالیان متمادی توسط اکثر گوسفندداران سایر نقاط مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند. بنابراین انتظار می‌رود این گوسفند با گوسفندان دیگر نقاط

معیار D_A را برای به‌دست آوردن موضع شناسی (Topology) صحیح، مناسب‌تر دانسته‌اند. همان‌طور که در ماتریس فواصل مربوط به فاصله D_A مشاهده می‌شود کمترین فاصله به ترتیب بین جمعیت‌های کردی خراسان و کردی کردستان ($0/234$) و بین سنجابی و کردی کردستان ($0/246$) می‌باشد که با توجه به هم‌منشا بودن دو جمعیت کردی و مدت زمان اندکی که از جدایی جغرافیایی آنها می‌گذرد یعنی حدود ۴۰۰ سال (۲) که در مقیاس تکاملی زمان بسیار کوتاهی محسوب می‌شود و همچنین بواسطه مجاورت مناطق پراکنش دو جمعیت کردی کردستان و سنجابی (استان‌های کردستان و کرمانشاه) و کم و بیش حضور هر دوی آنها در هر دو منطقه، منطقی به نظر می‌رسد. شباهت فنوتیپی بسیار نزدیک آنها نیز فاصله ژنتیکی کم بین آنها را تأیید می‌نماید.

با هر دو معیار بیشترین فاصله نیز به ترتیب بین جمعیت سنجابی و مغانی ($D_S=0/559$ و $D_A=0/388$)، جمعیت کردی خراسان و مغانی ($D_S=0/498$ و $D_A=0/371$) و نیز بین کردی



شکل ۲. دندروگرام حاصل از فاصله ژنتیکی D_A که به روش NJ تشکیل گردیده است. اعداد روی گره‌ها درصد تکرار آن گره را در دندروگرام‌های حاصل از ۱۰۰۰ بار جای‌گذاری نمونه‌ها نشان می‌دهد.

جایگاه-جمعیت و در هر جایگاه به‌ازای تمامی جمعیت‌ها بالا و مناسب (بین ۰/۵۰۶ تا ۰/۹۱۵) می‌باشد. بررسی معیارهای مختلف چند شکلی نیز حاکی از چند شکلی بسیار بالا در جایگاه‌های مورد مطالعه است به طوری که بر اساس تعریف چند شکلی می‌توان تمام آنها را ۱۰۰٪ چند شکل در نظر گرفت. بیشترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به جایگاه‌های McMA2 و OarCP26 با ۱۳ آلل و کمترین مربوط به جایگاه OarFCB304 با ۷ آلل بود. هم‌چنین بیشترین تعداد آلل مؤثر مربوط به جایگاه OarCP26 با ۱۰/۹ آلل و کمترین مربوط به جایگاه OarFCB304 با ۴/۷ آلل بود. با توجه به تعداد نمونه مورد بررسی، مقادیر مذکور حاکی از چند شکلی بسیار زیاد جایگاه‌های مورد مطالعه می‌باشد. در میان ۲۵ ترکیب جایگاه-جمعیت، بیشترین و کمترین ارزش PIC به‌ترتیب مربوط به جایگاه OarCP26 در جمعیت سنجابی (۰/۸۵۹۵) و جایگاه OarFCB304 در جمعیت کردی خراسان (۰/۴۶۷۹) می‌باشد. مقایسه مقادیر PIC در سطح جمعیت‌ها به‌ازای تمامی جایگاه‌ها که حاکی از سطح تغییرپذیری در داخل هر جمعیت است، نشان داد که بیشترین تغییرپذیری مربوط به جمعیت کردی کردستان (PIC=۰/۷۹۵۵) و کمترین مقدار به جمعیت کردی خراسان (PIC=۰/۶۹۲۳) تعلق دارد.

زمان انشقاق بین دو جمعیت کردی ۴۴۵ سال به‌دست آمد که با شواهد تاریخی که زمانی حدود ۴۰۰ سال را ذکر می‌کنند (۲) همخوانی دارد. برای برآورد زمان انشقاق نیاز به نرخ تغییر تعداد تکرار ریزماهوره‌های مورد مطالعه (α) می‌باشد که در

کشور فاصله ژنتیکی متوسطی داشته باشد ولی این امر نیاز به بررسی بیشتر دارد.

شکل ۲ دندروگرام حاصل از فاصله ژنتیکی D_A را که به روش NJ ترسیم گردیده است، نشان می‌دهد. تاکزاکمی و نی (۳۰) احتمال به‌دست آوردن موضع شناسی صحیح را با استفاده از D_A بالاتر دانسته‌اند. موضع شناسی کلی سه درخت از چهار درخت حاصل تقریباً یکسان می‌باشد و تنها درخت UPGMA حاصل از معیار D_S تفاوت اندکی را نشان داد. موضع شناسی هر چهار درخت حاصله بیشتر یک موضع شناسی جغرافیایی است.

در درختان NJ دو خوشه مجزا مشاهده می‌شود که یکی شامل سه جمعیت کردی کردستان، کردی خراسان و سنجابی است که با در نظر گرفتن همجواری جغرافیایی مناطق پراکنش و نیز شباهت فنوتیپی زیاد بین دو جمعیت کردی کردستان و سنجابی و هم‌چنین هم منشاء بودن دو جمعیت کردی قابل توجه می‌باشد. به‌ویژه آن‌که دو جمعیت هم منشاء یعنی کردی کردستان و کردی خراسان در یک زیرگروه واقع و سپس سنجابی با آنها یک گروه را تشکیل داد. مجزا بودن جمعیت مغانی (حداقل از سه جمعیت موجود درگروه اول) روشن است. ولی قرار گرفتن مغانی و مهربان در یک خوشه نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

نتایج تنوع درون جمعیتی حاکی از تنوع بالا در داخل هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه است به نحوی که متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار نا‌آریب در تمامی ترکیبات

تحقیقات علوم دامی کشور بود و تمامی کارهای آزمایشگاهی در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام شد. مؤلفین بر خود لازم می‌دانند از آقایان دکتر قره یاضی و دکتر دولتی که در زمینه فراگیری تکنیک‌های مربوطه همکاری فرمودند و نیز از همراهی و همکاری تمامی دوستان و همکاران در آزمایشگاه بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور تشکر نمایند. هم‌چنین از خانم دکتر Naoko Takezaki به‌خاطر ارسال نرم افزار POPTREE سپاسگزاریم.

ابتدا از نرخ ریزماهوره‌های انسانی یعنی $4/5 \times 10^{-4}$ استفاده شد. سپس با استفاده از زمان محاسبه شده، نرخ جهش هر یک از جایگاه‌های مورد مطالعه به‌دست آورده شد که در جایگاه OarFCB304 دقیقاً همان مقداری بود که ابتدا فرض شد ولی در سایر جایگاه‌ها دامنه تفاوت وسیعی مشاهده شد.

سپاسگزاری

این تحقیق کار مشترکی بین گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و بخش بیوتکنولوژی مؤسسه

منابع مورد استفاده

- آزادی، س. ۱۳۷۸. بررسی تنوع ژنتیکی در پنج نژاد گوسفند ایرانی با استفاده از مارکر RAPD. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- رسولی، س. ح. و ع. م. محمودی. ۱۳۷۸. گله داری و پرورش بز مرکز در استان کردستان. معاونت امور دام استان کردستان، ص ۱۵-۲۰.
- طاهری یگانه، الف. ۱۳۷۶. بررسی تنوع ژنتیکی سیستم‌های مارکری OPA، Tf، Gc در بعضی از گوسفندان بومی ایران و کاربرد آنها در آزمون رد اعقاب. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
- عصفوری، ر. ۱۳۷۶. مارکرهای ژنتیکی در ده نژاد از گوسفندان بومی ایران. پژوهش و سازندگی ۳۴: ۱۵۶-۱۶۲.
- Arranz, J. J., Y. Bayon and F. San Primitivo. 2001. Differentiation among spanish sheep breeds using microsatellites. *Geneti Selection and Evol.* 33: 529-542.
- Bancroft D.R., J.m. Pemberton and P. King. 1995. Extensive protein and microsatellite variability in an isolated, cyclic unregulate population. *Heredity* 74: 326-336.
- Barker, J.S.F. 1999. Conversation of livestock breed diversity. *Anim. Genet. Resour. Inform.* 25: 33-43.
- Buchanan, F.C. and A.M. Crawford. 1993. Ovine microsatellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266 and OarFCB304 loci. *Anim. Genet.* 24: 145.
- Buchanan, F.C. and T.D.Thue. 1998. Intrabreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 78: 425-428.
- Buchanan, F.C., L.J. Adams, R.P. Littlejohn, J.F. Maddox and A.M. Crawford. 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genom.* 22: 397-403.
- Bunch, T.D. and W.C. Foote. 1976. Chromosomes, hemoglobins, and transferins of Iranian donestic sheep. *The J. Heredity* 67: 167-170.
- Crawford, A.M., K.G. Dodds, A.J. Ede, C.A. Pierson, G.W. Montgomery, H.G. Garmonsway, A.E. Geattie, K. Davies, J.F. Maddox, S.W. Kappes, R.T. Stone, T.C. Nguyen, J.M. Penty. E.A. Lord, J.E. Broom, J. Buitkamp, W. Schwaiger, J.T. Epplen, P. Matthew, M.E. Matthews, D.J. Hulme, K.J. Beh, R.A. McGraw and C.W. Beattie. 1995. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* 140: 703-724.
- Diez-Tacson, C., R.P. Littlejohn, P.A.R. Almeida and A.M. Crawford. 2000. Genetic variation within the merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics* 31: 243-251.
- Ede, A.J., C.A. Pierson and A.M. Crawford. 1995. Ovine microsatellites at the OarCP9, OarCP16, OarCP20, OarCP21, OarCP23 and OarCP26 loci. *Anim. Genet.* 26: 129-131.
- Ede, A.J. C.A., Pierson, H. Henry and A.M. Crawford. 1994. Ovine microsatellites at the OarAE64, OarCP16, OarHH22, OarHH56, OarHH62 and OarVH4 loci. *Anim. Genet.* 25: 51-52.
- Farid, A., E. O'Reilly, C. Dollard and Jr. C.R. Kelsey. 2000. Genetic analysis of ten sheep breeds using

- microsatellite markers. *Can. J. Anim. Sci.* 80: 9-17.
17. Goldstein, D.B. and C. Schlotterer. 1999 *Microsatellites, evolution and applications*, First edition. Oxford University Press, New York.
 18. Hedrick, P. W. 1999. *Genetic of populations*, 2nd ed., Jones and Bartlett Pub., Sudbury, MA, USA.
 19. Maddox, J.F., C.D. Riffkin and K.J. Beh. 2000. Dinucleotide repeat polymorphism at the ovine McMA1, McMA2, McMA5, McMA8, McMA9, McMA11, McMA14, McMA20, McMA24, McMA26 loci. *Anim. Genet.* 31: 148-149.
 20. Maddox, J.F., K.P. Davis, A.M. Crawford, D.J. Hulme, D. Viaman, E.O. Cribw, B.A. Ferking, K.J. Beh, N. Kang, C.D. Riffkin, S.S. Moore, K.G. Odds, J.M. Lumsden. 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.* 11(1): 1275-1289.
 21. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
 22. Minch, E., A. Ruiz-Linares, D.B. Goldstein, M.W. Feldman and L.L. Cavalli-Sforza. 1995. *Microsat (Version 1.5d): a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data.* <http://www.lotka.stanford.edu/microsat.html>
 23. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
 24. Nei, M., F. Tajima and Y. Tatenno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Molecular Evol.* 19: 153-170.
 25. Ott, J. 1989. Program HET Version 1.10 . Utility programs for analysis of genetic linkage. Rockefeller University. New York, NY, USA. <ftp://linkage.rockefeller.edu/software/utilities/>.
 26. Stahlberger-Saitbekova, N., J. Schlapfer, G. Dolf and C. Gaillard. 2001. Genetic relationships in swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. *J. Anim. Breeding and Genetics* 118: 379-387.
 27. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biol. and Evol.* 4: 406-425.
 28. Sanguinetti, C.J., E.D. Neto and A.J.G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR product separated on polyacrylamide gels. *Biotech.* 17: 915-919.
 29. Swarbrick, P.A., F.C. Buchanan and A.M. Crawford. 1991. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF64 locus. *Animal Genetics* 22: 375-376.
 30. Takezaki, N. and M. Nei. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genet.* 144: 389-399.
 31. Takezaki, N. 2000. *POPTREE: Population tree construction*. University of advanced studies. Hayama, Kanagawa, Japan.
 32. Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis II*. 2nd ed., Sinauer Associates. Sunderland, MA, USA.
 33. Yeh, F.C., R. Yang and T. Boyle. 1999. *POPGENE. Version 1.31*. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.