

Mitochondrial Haplogroups of Iranian Kurdish Population: An Efficient Instrument in Diagnosis of Unrecognized Bodies

Received: 19 June 2013

Revised: 3 September 2013

Accepted: 5 September 2013

ABSTRACT

Naghme Sadat Lessani^{1*}
Mohammad Taghi Akbari²
Shohre Zare Karizi³

¹MSc Student, Department of Biology, Sciences & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Assistant professor of Medical Genetics, Department of Medical Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Assistant professor, Department of Biology, Pishva Unit, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Background: Analysis of the nucleotide composition of the mitochondrial control regions HV1, HV2 and the SNPs in the coding region are routinely and widely used in differentiation of populations, ethnic groups and individuals. The speed of the nucleotide variation in the sequence of the mitochondrial control regions are at least ten times more than the nuclear genome and uniparental (maternal) inheritance. These characteristics are utilized in anthropology, criminal and judicial investigations such as identifying unrecognized corpse and human remains. The present report is the result of haplogrouping of a Kurdish population, inhabitants of Kermanshah and its suburbs, as part of a broader research to identify the haplogroups of Iranians.

Materials and Methods: DNA was extracted from 2 ml whole blood from 87 individuals of Kurdish origin living in Kermanshah and its suburbs. The mitochondrial HV1 and HV2 control regions were sequenced following PCR amplification. The sequence data were compared with Cambridge Reference Sequence, and by using ClustalX program haplogrouping was achieved. For differentiating between H and U haplogroups, the status of two coding SNPs of 7028 and 12308 were also determined by PCR-RFLP.

Results: In 87 studied mitochondrial DNA samples 262 nucleotide variants were identified in HV1 region alone. The identified haplogroups were as follows according to their frequency preponderance: J,H,U,L3a and T.

Conclusion: In this Kurdish population Eurasian haplogroups were predominant, although African haplogroup was present at a lower frequency. The findings of this study can also be used as a database for Iranian populations.

*Corresponding Author:

MSc Student, Department of Biology
Tel : (+98) 9123352813

Email: naghme.lessani@gmail.com

Key words: mitochondrial genome, haplotypes, haplogroups, Kurdish population

هاپلوگروپ های ژنوم میتوکندری در یک جمعیت از قوم کرد ایرانی:

ابزاری در تشخیص افراد مجهول الهویه

تاریخ دریافت: ۲۹ خرداد ۱۳۹۲ تاریخ اصلاح: ۱۲ شهریور ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱۴ شهریور ۱۳۹۲

مقدمه: بررسی ناحیه کنترل متشکل از نواحی HV^1 ، HV^2 و SNP های موجود در ناحیه رمزشونده ژنوم میتوکندری در افتراق جمعیت ها، اقوام و افراد کاربرد دارد. سرعت ایجاد تنوع نوکلئوتیدی ناحیه کنترل ده برابر سریعتر از DNA کروموزومی می باشد و وراثت مادری دارد. از این ویژگی در انسان شناسی، بررسی های جنایی و قضایی مثلاً شناسایی افراد مجهول الهویه استفاده می شود. هدف از این تحقیق شناسایی هاپلوگروپ های اقوام ایرانی می باشد. در این مقاله هاپلوگروپ های گروهی از جمعیت کرد گزارش می شود.

مواد و روش ها: در این مطالعه هاپلوטיפ های نواحی فوق و SNP های 7028 و 12308 منطقه رمزشونده ژنوم میتوکندری، ۸۷ نفر از قوم کرد بررسی شد. ۲ میلی لیتر خون محیطی از افراد غیرخویشاوند در لوله های EDTA دار تهیه و ضمن تخلیص DNA ژنومیک، نواحی HV^1 و HV^2 تکثیر و تعیین توالی گردید. توالی ها توسط برنامه ClustalX با توالی مرجع کمبریج مقایسه گردید، پلی مورفیسیم ها مشخص و از طریق درخت فیلوژنتیک، هاپلوگروپ ها تعیین و فراوانی آن ها مشخص گردید. برای اطمینان از تعیین هاپلوگروپ های H و U از روش RFLP استفاده شد.

یافته ها: در ۸۷ الگوی میتوکندری حاضر، ۲۶۲ نوکلئوتید جهش یافته در HV^1 دیده شد. هاپلوگروپ های H, U, K, J, T, L3A مشخص گردید. هاپلوگروپ های J و H دارای بالاترین فراوانی و هاپلوگروپ های U و L3a در رتبه بعدی قرار می گیرند.

نتیجه گیری: در قوم کرد هاپلوگروپ های اوراسیای غربی غالب است، اگرچه هاپلوگروپ آفریقایی نیز در این جمعیت دیده شد. همچنین یافته های این پژوهش می تواند بعنوان پایگاه داده ها برای جمعیت ایرانی به کار برده شود.

کلید واژه ها: ژنوم میتوکندری، هاپلو تیپ، هاپلوگروپ، قوم کرد

چکیده

نغمه سادات لسانی^{۱*}
محمدتقی اکبری^۲
شهره زارع کاربزی^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
^۲ استادیار ژنتیک پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
^۳ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی، واحد پیشوا، پیشوا، ورامین، ایران.

* نویسنده مسئول:

دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک
تلفن: ۹۱۲۳۳۵۲۸۱۳ (+۹۸)

پست الکترونیک:

naghme.lessani@gmail.com

مقدمه

از پسر و دختر به ارث می رسد. نقش میتوکندری تولید انرژی سلول به صورت ATP^1 می باشد [۱]. ژنوم میتوکندری، علاوه بر ناحیه ی کد کننده ی پروتئین، ناحیه ای به نام کنترل دارد که دو توالی بسیار

میتوکندری اندامکی درون سلولی است که دارای ژنوم حلقوی با ۱۶۵۶۹ جفت باز می باشد و فقط از طریق مادر به کلیه فرزندان اعم

¹: Adenosine Triphosphate

دودمان‌ها رخ داده است. یعنی واگرایی از متأخرترین جده مشترک در چه زمانی بوده است [۸]. طبقه‌بندی DNA میتوکندری انسان به هاپلوگروپ‌ها امکان بررسی موضوعات مهمی در انسان‌شناسی نظیر ردیابی مهاجرت و پراکنش دودمان‌های مختلف انسانی و پزشکی قانونی را فراهم آورده است. در پزشکی قانونی از mtDNA می‌توان در تشخیص هویت افراد و باقی‌مانده اجساد مجهول‌الهویه بهره‌برداری نمود [۲]. با تعیین هاپلوگروپ‌های اقوام ایرانی مقایسه آنها با یکدیگر و جمعیت‌ها و اقوامی که در همسایگی این سرزمین زندگی می‌کنند می‌توان پدیده‌های مهاجرت و اختلاط جمعیت‌ها را استنتاج نمود. هدف از انجام این پژوهش، تعیین هاپلوگروپ‌های ژنوم میتوکندری در یکی از جمعیت‌های کرد می‌باشد، که از آن می‌توان در مسایل پزشکی قانونی بهره‌برداری نمود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه هاپلوטיפ‌های ناحیه HV^۱ و HV^۲ ژنوم میتوکندری در ۸۷ نفر از قوم کرد از استان کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفت. پس از کسب رضایت از افراد غیرخویشاوند براساس محل تولد و اطلاعات مربوط به ۳ نسل متوالی بنا خود اظهارهای توسط خود افراد، میزان ۲ میلی لیتر خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA تهیه و اقدامات آزمایشگاهی به شرح زیر انجام شد: پس از تخلیص DNA ژنومیک با روش Salting out ناحیه HV^۱ و HV^۲ با پرایمرهایی که در جدول ۱ آمده است، با روش PCR^۴ تکثیر شدند.

واکنش PCR در حجم ۳۰ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم DNA، X^۱ PCR Buffer، ۰/۲۵ میلی مولار از هر dNTP، ۲/۲ میلی مولار MgCl_۲، ۱۰ پیکومول از مخلوط پرایمرها و ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase صورت گرفت. تکثیر در ۲۶ سیکل، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و طولیل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از تکثیر نواحی مورد نظر، نمونه‌ها تعیین توالی

متغیر HV^۱ و HV^۲ را در بر گرفته است. در ناحیه رمزشونده نیز SNP^۲ های متعددی وجود دارند که در تعیین هاپلوگروپ‌ها استفاده می‌شود [۲].

به مجموع پلی‌مورفیسم‌ها (واریانت) که در مجاورت یکدیگر قرار دارند هاپلوטיפ می‌گویند. از تجمع هاپلوטיפ‌ها خوشه‌هایی به صورت هاپلوگروپ بر روی درخت فیلوژنتیک شکل می‌گیرد [۳]. درخت فیلوژنتیک DNA میتوکندری^۳ (mtDNA) به بزرگ هاپلوگروپ‌های R، M، N و L طبقه‌بندی شده و هر یک از این هاپلوگروپ‌های بزرگ خود به زیر هاپلوگروپ‌هایی تقسیم‌بندی می‌شوند. هر یک از بزرگ هاپلوگروپ‌ها به یک منطقه جغرافیایی خاص از کره زمین تعلق دارد. زیر هاپلوگروپ‌های L به قاره آفریقا تعلق دارند. هاپلوگروپ‌های D، G، Z و C که متعلق به ماکروهاپلوگروپ M می‌باشد در اوراسیای شرقی [۴] و هاپلوگروپ‌ها H، U، T، J، HV و V که متعلق به بزرگ هاپلوگروپ R می‌باشند، بیشتر در اوراسیای غربی دیده می‌شوند [۵و۶].

اهمیت مطالعه DNA در آن است که دارای توارث تک‌والدی (مادری) بوده و در آن نوترکیبی رخ نمی‌دهد. DNA هسته‌ای در انتقال از هر نسل به نسل بعد در فرآیند میوز دچار نوترکیبی و آرایش و ترکیب آن دگرگون شده و تنها نیمی از آن از هر والد به نسل بعد منتقل می‌گردد؛ در حقیقت نیمی از DNA هسته‌ای والدی به رمز ژنی زاده می‌رسد. در صورتیکه mtDNA منحصراً از طریق مادر به پسر و دختر وی به ارث می‌رسد. در ضمن DNA میتوکندری به دلیل عوامل اکسیداتیو و نبود سیستم مرمت DNA مستعد پذیرش جهش می‌باشد که این جهش‌ها امکان طبقه‌بندی مناسب Cladistic برای مطالعات اجدادی را فراهم می‌آورد [۷و۱]. این شیوه توارث و ویژگی ساختمانی متفاوت آن امکان ردیابی دودمان انسانی را در اعماق زمان گذشته فراهم می‌آورد. واگرایی این دودمان‌ها از یکدیگر و حتی زمان واگرایی بین جمعیت‌ها و افراد را می‌تواند به ما نشان دهد. تفاوت‌های DNA میتوکندری ناشی از جهش‌ها به ما سر نخ‌ی برای ارتباطات بین افراد به دست می‌دهد و میزان جهش‌ها (تفاوت‌ها) نشان می‌دهد که چه زمانی واگرایی بین

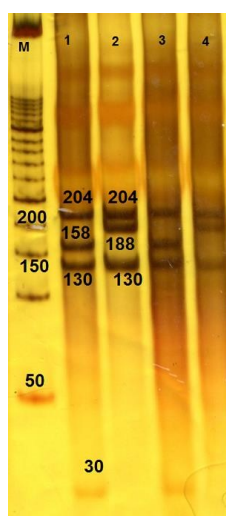
¹: Hyper variable, ²:Single Nucleotide Polymorphism, ³:Mitochondrial Deoxyribonucleic acid, ⁴: Polymerase Chain Reaction

جمعیت در تعدادی از نمونه‌ها تغییر در باز ۱۶۱۸۹ ناحیه HV1 رخ داده بود که باعث به هم ریختگی در توالی می‌شد که این پدیده با

توالی پرایمر	پلی مورفیسیم
5'CAATTGGCTTCCTAGGGTTTATC3'	C7028T-F
5'GGATGTTTCATGTGGTGTATGC3'	C7028T-R
5'ATTACCGAGAAAGCTCACAAG3'	A12308G-F
5'TTTTATTTGGAGTTGCACCAAGAT3'	A12308G-R

جدول ۲: توالی پرایمرهای پلی مورفیسیم

عنوان Slippage شناخته می‌شود و به همین دلیل تعیین هاپلوگروپ برای آنها میسر نشد. علاوه بر این هاپلوگروپ‌های تعدادی از نمونه‌ها با توجه به اطلاعات به دست آمده شناسایی



شکل ۱: ژل الکتروفورز و قطعات ایجاد شده برای SNP ۷۰۲۸. در ستون اول مارکر نشان داده شده است. در ستون‌های ۱ و ۳ تغییر C به T دیده شده است و طی هضم آنزیمی، ۴ قطعه با طول‌های ۳۰، ۱۳۰، ۱۵۸ و ۲۰۴ جفت باز ایجاد گشته است. در ستون‌های ۲ و ۴ تغییر بازی C به T دیده نشده است و طی هضم آنزیمی ۳ قطعه با طول‌های ۱۳۰، ۱۸۸ و ۲۰۴ جفت باز ایجاد گشته است.

گردیدند. توالی‌های به دست آمده با برنامه ClustalX با توالی مرجع کمبریج موجود در سایت^۱ NCBI، مقایسه و نوکلئوتیدهای جهش یافته و پلی مورفیسیم‌ها در ژنوم میتوکندری هر فرد مشخص گردید. بر اساس تغییرات به دست آمده، از طریق درخت فیلوژنتیک ژنوم میتوکندری، هاپلوگروپ هر یک از افراد مشخص شد و فراوانی هاپلوگروپ‌ها تعیین گردید [۹]. پس از تعیین هاپلوگروپ‌ها، مشخص گردید که برای اطمینان از هاپلوگروپ‌های H و U نیاز است برای SNP های ۷۰۲۸ و ۱۲۳۰۸ ناحیه کدکننده از روش RFLP^۲ با آنزیم‌های مربوطه استفاده شود. بدین صورت پس از تکثیر این نواحی با پرایمرهای طراحی شده، برای هضم آنزیمی ناحیه ۷۰۲۸ از آنزیم محدودالتر AluI و برای ناحیه ۱۲۳۰۸ از آنزیم محدودالتر HinfI استفاده گردید. در جدول ۲ پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر SNP های ۷۰۲۸ و ۱۲۳۰۸ آمده است.

پس از هضم، برای SNP ۷۰۲۸ در صورت عدم تغییر ۳ قطعه و در صورت تغییر ۴ قطعه ایجاد می‌گردد که در صورت تغییر از هاپلوگروپ H اطمینان حاصل می‌شود. در شکل ۱ ژل الکتروفورز و قطعات ایجاد شده نشان داده شده است. برای SNP ۱۲۳۰۸ نیز در صورت عدم تغییر ۱ قطعه و در صورت تغییر ۲ قطعه ایجاد می‌گردد که در صورت تغییر از هاپلوگروپ U اطمینان حاصل می‌گردد. در شکل ۲ ژل الکتروفورز و قطعات ایجاد شده نشان داده شده است.

یافته‌ها

۲۶۲ تغییر نوکلئوتیدی دیده شد. ۲۳۴ مورد از نوع انتقالی و ۲۵ مورد از نوع متقاطع می‌باشد. ۳ مورد نیز افزایش باز دیده شد. در این

طول قطعه	توالی پرایمر	قطعه
۵۰۰bp	ACCAGTCTTGTAACCGGAGATG 5'	F-HV1
	3'	R-HV1
	TGCGGGATATTGATTCACG 3'	
۵۰۰bp	TATCACCTATTAACCACTCACG3 5'	F-HV2
	5'	R-HV2
	TGAGATTAGTAGTATGGGAGTGGG3	

جدول ۱: توالی پرایمرهای قطعات HV1 و HV2

¹: National Center for Biotechnology Information, ²: Restriction fragment length polymorphism

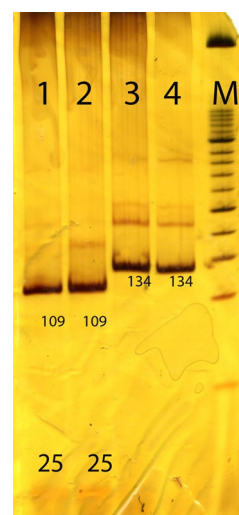
Sample	Haplogroup	HV1	HV2	RFLP
17749	H	G16213A, T16342C	T152C, A263G	C7028T
17913	U	A16343G	A73G, C150T, A263G	A12308G
10359	U7	A16309G, A16318T	A73G, T152C, A153G, A263G	-
18096	K	T16093C, T16224C, T16311C	A73G, T146C, C150T, A263G	-
19989	J	C16069T, T16126C, C16192T	A73G, G185A, G228A, A263G	-
19325	J1	C16069T, T16126C, G16145A, C16261T	-	-
166	J1b	C16069T, T16126C, G16145A, C1622 2T, C16261T	-	-
178	J2	C16069T, T16126C, C16193T	-	-
19381	T	T16126C, C16294T, C16360T	A73G, G97T, T152C, A214G, A263G	-
61	T1	T16126C, A16163G, C16186T, T16189 C, C16294T	A73G, T146C, T152C, T195C, A263G	-
16243	L3a	G16129A, C16223T, C16148T	A73G, T199C, A263G	-
18727	Slippage	A16158G, T16189C	A73G, A263G, A269G	-
155	Others	C16294T, T16304C	-	۷۰۲۸C

جدول ۳: تغییرات نوکلئوتیدی ناحیه HV1 و هاپلوگروپ های تعیین شده.

نشد و با عنوان سایر هاپلوگروپ ها یا others معرفی گردید. در جدول ۳ نمونه ای از هاپلوگروپ های یافت شده در این قوم به همراه تغییرات خاصی که در ناحیه HV1 و HV2 دارند، آورده شده است.

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، از ۸۷ الگوی میتوکندری بررسی شده ۱۷ مورد Slippage دیده شد. از ۷۰ نمونه ی دیگر، بیشترین فراوانی ها متعلق به هاپلوگروپ های J و H با ۲۱٪، هاپلوگروپ U با ۱۶٪، هاپلوگروپ L³a با ۱۴٪، هاپلوگروپ T با ۸٪، هاپلوگروپ K با ۴٪ و سایر هاپلوگروپ ها با ۱۵٪ دیده شد. در نمودار ۱ هاپلوگروپ ها به همراه فراوانی هایشان آمده است.



شکل ۲: ژل الکتروفورز و قطعات ایجاد شده برای SNP ۱۲۳۰۸. در این شکل در ستون آخر مارکر با قطعات مشخص قرار دارد. در ستون ۱ و ۲ به دلیل تبدیل باز A به G در جایگاه ۱۲۳۰۸، با هضم آنزیمی دو قطعه ۱۰۹ و ۲۵ جفت بازی ایجاد می گردد. در ستون های ۳ و ۴ این تغییر باز روی نداده است و تنها یک قطعه با طول ۱۳۴ جفت باز ایجاد می گردد.

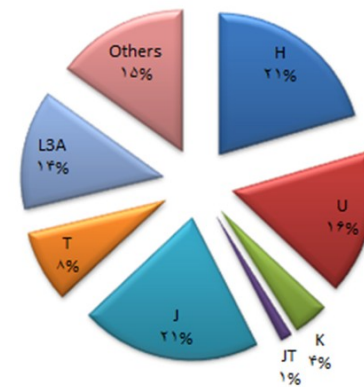
میتوکندری اروپایی ها و هاپلوگروپ K حدود ۱/۹٪ در ژنوم میتوکندری اروپایی ها دیده شده است [۱۳]. در مطالعه حاضر هاپلوگروپ های J و H با فراوانی ۲۱٪، U با ۱۶٪، L3A با ۱۴٪، T با ۸٪، K با ۴٪ و سایر هاپلوگروپ ها با ۱۵٪ دیده شد که تشابه بالایی با هاپلوگروپ های شناخته شده جمعیت های اروپایی را نشان می دهند. این مطالعه نشان می دهد که در قوم کرد شاخه های مخصوص به اوراسیای غربی (H, U, T, J) غالب است. علاوه بر این، به صورت پراکنده و با فراوانی اندکی هاپلوگروپ مربوط به آفریقا نیز در این جمعیت دیده شده است. حال این پژوهش می تواند گامی مؤثر در جهت ساخت پایگاه داده ها باشد برای ایران و اقوام آن، تا در صورت نیاز بتوان در پزشکی قانونی برای تشخیص افرادی با هویت مجهول استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

این پروژه مورد حمایت مالی آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران به شماره گرانت ۹۰۰۰۵ قرار داشت. مؤلفین از همکاری صمیمانه کارشناسان محترم آزمایشگاه از جمله خانم ها بهمنی، صراحی، فرحزادی و خلیلی و همچنین کارکنان بیمارستان طالقانی کرمانشاه جهت کمک به جمع آوری نمونه ها تشکر و قدردانی می کنند.

منابع

- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci 1980; 77: 6715-9.
- Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework. Forensic Sci Rev 1999; 11: 21-50.
- Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations. Annu Rev Genomics Hum Genet 2003; 4: 119-41.
- Kivisild T, Tolk HV, Parik J, Wang Y, Papiha SS, Bandelt HJ, et al. The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA tree. Mol Biol Evol 2002; 19: 1737-51.
- Torrioni A, Richards M, Macaulay V, Foster



نمودار ۱: فراوانی هاپلوگروپ های قوم کرد

از تفاوت در توالی نوکلئوتید های ژنوم میتوکندری می توان برای ایجاد شبکه فیلوژنتیک، نشان دادن رابطه این تغییرات با موقعیت جغرافیایی و تخمین زمان پیدایش هاپلوگروپ ها بهره گرفت [۱۰]. در ابتدا تصور می شد، حدود ۷۷ درصد از ژنوم میتوکندری آسیایی ها متعلق به هاپلوگروپ M باشد [۱۱] و چون ایران در آسیا قرار گرفته، انتظار می رفت که فراوانی بالایی از این هاپلوگروپ در ایران مشاهده شود. اما نتایج هوشمند و همکاران [۱۳ و ۱۴] فراوانی بسیار پایینی از این هاپلوگروپ را نشان داده است. در بررسی حاضر نیز همین پدیده مشاهده می شود و هیچ یک از افراد مورد مطالعه در جمعیت کرد دارای هاپلوگروپ M نبودند. از سویی دیگر حدود ۹۹ درصد از ژنوم میتوکندری اروپایی ها حداقل متعلق به یکی از ۹ هاپلوگروپ X، W، V، U، T، K، J، I و H می باشد. ۶ هاپلوگروپ W، T، K، J، I و H منحصراً به جمعیت اروپایی تعلق دارد و احتمالاً از قفقاز منشا گرفته اند، که به طور ژنتیکی از آفریقای ها و آسیایی ها جدا شده اند. برآورد شده است که منشأ هاپلوگروپ های V، T، K، J و H به حدود ۳۰۰۰-۸۰۰۰ سال پیش باز می گردد. با مطالعات انجام شده این فرضیه تأیید می شود که هاپلوگروپ های نام برده بعد از جدایی ژنتیکی و جغرافیایی اجداد قفقازی از اجداد آفریقای و آسیایی مدرن منشا گرفته اند. از سویی دیگر، هاپلوگروپ U از دیگر هاپلوگروپ ها قدیمی تر است و احتمالاً منشأ آن به ۵۱۰۰۰ تا ۶۷۰۰۰ سال پیش برمی گردد. ممکن است این هاپلوگروپ از آفریقا منشأ گرفته و به دنبال آن در شرق و اروپا گسترش یافته باشد [۱۲]. هاپلوگروپ J حدود ۳/۱۱٪ در ژنوم

- P, VILLEMS R, NORBY S, et al. mtDNA haplogroups and frequency patterns in Europe. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1173-7.
6. Tetzlaff S, Brandstatter A, Wegener R, Parson W, Weirich V. Mitochondrial DNA population data of HVS-I and HVS-II sequences from northeast German sample. *Forensic Sci Int* 2007; 172: 218-24.
 7. Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 1999; 238: 211-30.
 8. Allard MW, Wilson MR, Monson KL, Budowle B. Control region sequences for East Asian individuals in the scientific Working Group on DNA analysis methods forensic mtDNA data set. *Leg med* 2004; 6: 11-24.
 9. Richards MB, Macaulay VA, Bandelt HJ, Sykes B. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann Hum Genet* 1998; 62: 241-60.
 10. Hein J, Schierup M, Wiuf C. *Gene genealogies, variation and evolution: a primer in coalescent theory*. Oxford University press; 2004: 173-86.
 11. Ballinger SW, Schurr TG, Torroni A, Gan YY, Hodge JA, Hassan K, et al. Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient mongoloid migrations. *Genetics* 1992; 130: 139-52.
 12. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, et al. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 1996; 144: 1835-50.
 13. Houshmand M, Sanati M-H, Vakilian M, Akuchekian M, Babrzadeh F, Teimori M, et al. Investigation of the mitochondrial haplogroups M, BM, N, J, K and their frequencies in five regions in Iran. *Iranian J Biotechnol* 2004; 2: 44-8.
 14. Fakhraz, M, Tavalaei M, Houshmand SM. Mitochondrial genome as a powerful tool for identity. *SJFM* 2008; 14: 166-71. (Persian)

