پژوهش‌های محیط‌زیست، سال ۵، شماره ۱۰، پاییز و زمستان ۱۳۹۳، از صفحه ۲۱۱ تا ۲۱۷

شناسایی گوشت‌خواران بزرگ جثه بر اساس پلی‌مورفیسم طول ناحیه‌کنترل DNA میتوکندری در ایران

وحید زمانی[۱]، حمیدرضا رضایی*[۲]، سید محمود عقیلی[۳]، مرضیه اسدی‌آقبلاغی[۴]،علی شعبانی[۵]، نوید زمانی[۴]

۱ دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد مهندسی منابع طبیعی محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان
۲ استادیار گروه محیط‌زیست، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان
۳ دانشیار گروه محیط‌زیست، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان
۴ دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد مهندسی منابع طبیعی محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران
۵ دانشیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۲۱؛ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۰/۲۴)

چکیده

مطالعه روی گوشت‌خواران به دلیل جمعیت محدودشان و ویژگی‌های رفتاری خاص این گونه‌ها بیشتر به صورت غیرمستقیم و به کمک نمایه‌ها صورت می‌گیرد که همواره با اشتباهاتی نیز همراه است. با توجه به کاهش شدید گوشت‌خواران در اکثر زیستگاه‌های طبیعی در سطح کشور، شناسایی دقیق این گونه‌ها جهت اجرای برنامه‌های حفاظتی ضروری است. استفاده از ژنوم میتوکندری به دلیل نرخ جهش‌پذیری بالا، یک روش استاندارد جهت شناسایی پستانداران می‌باشد. در این مطالعه ۱۴ گونه گوشت‌خوار (هفت گونه گربه‌سان، پنج گونه سگ‌سان، یک گونه کفتار و یک گونه خرس) بر اساس پلی‌مورفیسم طول ناحیه‌کنترل میتوکندری و با استفاده از آغازگرهای عمومی مورد بررسی قرار گرفتند که در نهایت، ۱۳ گونه شناسایی شد. روش به کار گرفته شده در این پژوهش، روشی به نسبت تکرارپذیر، سریع و کم هزینه است که می‌تواند جهت شناسایی دقیق گونه‌ها و گونه‌های گوشت‌خوار حضور و عدم حضور این گونه‌های نادر در زیستگاه و نیز گونه‌های مشکوکی که از متخلفان و یا سایر موارد به‌دست می‌آیند، مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: گوشت‌خواران، پلی‌مورفیسم، ژن ناحیه‌کنترل، دی‌ان‌ای میتوکندری، آغازگر عمومی

*نویسنده مسوول: Email: rezaei@gau.ac.ir

سرآغاز

یکی از مسایل اساسی در زیست‌شناسی حفاظت، شناسایی دقیق گونه‌ها می‌باشد (Frankham, 2005). در گذشته، اغلب روش‌های شناسایی مبتنی بر روش‌های ریخت‌شناسی بودند. امروزه، با بررسی تغییرات ژنتیکی به راحتی می‌توان اطلاعات با ارزشی در خصوص شناسایی گونه‌ها با استفاده از نمونه‌های غیرتهاجمی (نمونه‌هایی که بدون نیاز به کشتن جانوران و یا آسیب رساندن به جانوران به دست می‌آیند) مانند: مو و استخوان به‌دست آورد (Imaizumi et al., 2007; Bellis et al., 2003; Balitzki et al., 2005; Riddle et al., 2003; Kitano et al., 2007). ژنوم میتوکندری به دلیل دارا بودن تعداد نسخه‌های بیش‌تری در هر سلول نسبت به ژنوم هسته و نیز نرخ بالای جهش‌پذیری نسبت به ژنوم هسته، اختلاف بین گونه‌ها را بهتر نمایان می‌کند و در شناسایی گونه‌ها کاربرد بیش‌تری دارد (Rastogi et al., 2007; Nakamura et al., 2009; Bellis et la., 2003; Williams et al., 2004; Bardeleben et al., 2005; Savolainen et al., 2000).

همچنین، بین قسمت‌های مختلف ژنوم میتوکندری داده‌های ناحیه کنترل برای شناسایی گونه‌های نزدیک به هم مناسب‌تر از ژن سیتوکروم *b* و سایر نواحی کد کننده پروتئین است (Pun et al., 2009) و با توجه به حساسیت‌پذیری بالای دی‌ان‌ای میتوکندری با استفاده از این ژنوم می‌توان نمونه‌های ناشناخته و یا مشکوک که از شکارچیان متخلف یا سایر موارد به‌دست می‌آیند را به طور دقیق شناسایی کرد (Parson et al., 2000).

گوشت‌خواران ۱۰٪ جنس‌های پستانداران و فقط ۲٪ زی‌توده کل پستانداران را تشکیل می‌دهند (Eisenberg, 1981). از راسته گوشت‌خواران، تاکنون ۱۲ خانواده ۱۱۴ جنس و ۲۶۴ گونه در سطح دنیا معرفی شده است (Gittleman, 1989). در ایران، تاکنون ۸ خانواده و ۳۱ گونه گوشت‌خوار شناسایی شده که دو گونه از آن‌ها (شیر و ببر) منقرض شده‌اند و در بسیاری از مناطق کشور به علت تعقیب و شکار بی‌رویه، تخریب زیستگاه و اشغال آشیان‌ها توسط گوشت‌خوارن اهلی مانند سگ، جمعیت آن‌ها به شدت دچار کاهش شده و خطر انقراض نسل این موجودات را تهدید می‌کند (فیروز، ۱۳۷۸؛ ضیائی، ۱۳۸۸). گوشت‌خواران از گونه‌های کلیدی اکوسیستم‌ها به شمار می‌آیند و مطالعه و شناسایی این گونه‌های حساس و پر نیاز می‌تواند رهگشای مطالعه و مدیریت سایر گونه‌ها نیز باشد. بسیاری از گونه‌های گوشت‌خوار به خصوص در زیستگاه‌های جنگلی دارای ویژگی‌های رفتاری خاص مانند شبگردی و استتار هستند. بنابراین، تصمیم‌گیری در مورد اصولی‌ترین اقدام‌های حفاظتی در مورد آن‌ها سخت و یا غیرممکن است (Riddle et al., 2003). چنانچه در بسیاری از طرح‌های مدیریت مناطق حفاظت شده و پارک‌های ملی، شناسایی فون پستانداران و همینطور حضور و عدم حضور گونه‌های گوشت‌خوار با ابهام مواجه است. از سوی دیگر در مبحث تخلفات شکار، سازمان‌های حفاظت محیط‌زیست در اثبات جرم و تخلف صورت گرفته و برخورد با شکارچیان متخلف با مشکل مواجه هستند. بنابراین، ارایه روشی مبتنی بر ویژگی‌های مولکولی برای شناسایی حیوانات شکار شده و ارایه مدرک معتبری برای مراکز قضایی ضروری می‌نماید که در این پژوهش تلاش شد با استفاده از پلی‌مورفیسم طول ناحیه‌کنترل میتوکندری روشی مناسب از لحاظ اقتصادی، سریع و قابل اطمینان جهت شناسایی گوشت‌خواران وحشی ارایه شود.

مواد و روش‌ها

• نمونه‌برداری

با توجه به این‌که اکثر گونه‌های گوشت‌خوار کمیاب و حفاظت شده هستند، از ۲۵ فرد حیوان گوشت‌خوار (۱۴ گونه) در نقاط مختلف کشور از طریق روش‌های غیرتهاجمی و تلفات جاده‌ای نمونه بافت تهیه شد جدول (۱). همچنین، یک نمونه ناشناخته نیز از شکارچیان متخلف به‌دست آمد (شکارچیان پس از اطلاع از آگاهی مامورین سازمان حفاظت محیط‌زیست محل را به همراه لاشه جانور ترک نموده و تنها قسمتی از بافت‌های داخلی مانند معده و کبد جانور در محل شکار باقی مانده بود که نمونه‌برداری از آن‌ها صورت گرفت). نمونه‌ها ابتدا در الکل و سپس در سیلیکاژل قرار گرفتند و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شدند.

• آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های بافتی در سیلیکاژل تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت (AccuPrep) صورت گرفت و DNA استخراجی تا زمان PCR، در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. کیفیت و کمیت DNA استخراجی نیز با استفاده از ژل آگاروز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین شد (شکل ۱).

جدول (۱): محل جمع‌آوری نمونه‌ها و نوع بافت مورد استفاده.

نام فارسی	نام علمی	محل نمونه‌برداری	نوع بافت	تعداد نمونه
پلنگ	*Panthera pardus*	گلستان	کبد، پوست، عضله	۳
یوزپلنگ	*Acinonyx jubatus venaticuc*	یزد، سمنان	کبد، عضله	۲
گربه وحشی	*Felis silvestris*	گلستان، خراسان شمالی	عضله	۲
گربه جنگلی	*Felis chaus*	گلستان، مازندران	کبد، عضله	۴
گربه شنی	*Felis margarita*	اصفهان	عضله	۱
کاراکال	*Caracal caracal*	یزد	کبد	۱
گربه خانگی	*Felis catus*	گلستان	پوست	۱
خرس قهوه‌ای	*Ursus arctos*	گلستان، خراسان شمالی	عضله	۲
کفتار	*Hyena hyena*	گلستان	عضله	۱
گرگ	*Canis lupus*	خراسان شمالی، همدان	کبد، عضله	۲
سگ	*Canis lupus Familiaris*	خراسان رضوی	عضله	۱
شغال	*Canis aureus*	گلستان، خراسان رضوی	عضله، پوست	۲
شاه روباه	*Vulpes cana*	اصفهان	عضله	۱
روباه معمولی	*Vulpes vulpes*	کردستان، گلستان	عضله، پوست	۲

• واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و الکتروفورز

به منظور بررسی پلی‌مورفیسم توالی ناحیه کنترل در گوشت‌خواران بزرگ جثه قطعه چپ ناحیه‌کنترل mtDNA که بسیار تغییرپذیر، است توسط آغازگر پیشرو (Taberlet et al., 1994 L15995 و H16498)آغازگر پسرو (Fumagalli et al., 1996) تکثیر شد (جدول ۲). این آغازگرها به ترتیب برای ژن محافظت شده tRNA-Proline و ناحیه مرکزی و حفاظت شده ناحیه‌کنترل طراحی شده‌اند.

تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل۲۰ نانوگرم DNA یک واحد بین‌اللملی taq DNA پلی‌مراز، بافر ۱x PCR، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. چرخه دمایی برای تکثیر ناحیه‌کنترل ژنوم میتوکندری عبارت بود از: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۴۰ – ۳۵ چرخه، شامل۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه و بسط نهایی با ۷۲ درجه در ۵ دقیقه. سپس محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگاروز دو درصد و ژل اکریل آمید ۸ درصد جداسازی شدند و در نهایت، تصاویر مربوط به ژل‌ها با استفاده از دستگاه مستندساز ژل ثبت شد و اندازه باندها با استفاده از نرم‌افزار Gel pro Analyzer در مقایسه با مارکر به طور دقیق ثبت شد. قابل ذکر است که پس از تشکیل باند روی ژل، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تهیه ژل برای هر گونه پنج بار تکرار شد.

جدول (۲): ویژگی‌های جایگاه ژنی و آغازگر به کار برده شده در این مطالعه

جایگاه ژنی	آغازگر	دمای اتصال
D-LOOP	F-5´CTCCACTATCAGCACCCAAAG-3´ R-5´CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3´	۵۴

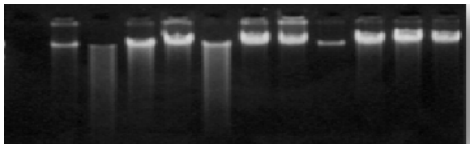
• تجزیه و تحلیل

توالی ناحیه کنترل گونه‌های گوشت‌خوار مورد مطالعه ثبت شده در ژن‌بانک از طریق بلاست کردن با آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش در ژن بانک جستجو شدند و مرتب‌سازی ردیف توالی‌ها با استفاده از هم‌آرایی در نرم‌افزار مگا صورت گرفت و سپس طول توالی‌ها اندازه‌گیری شد. در نهایت، طول توالی‌های به دست آمده از گونه‌های ثبت شده در ژن بانک با طول توالی‌های به دست آمده در این پژوهش مقایسه شدند.

یافته‌ها

• بررسی کمی و کیفی DNA استخراجی

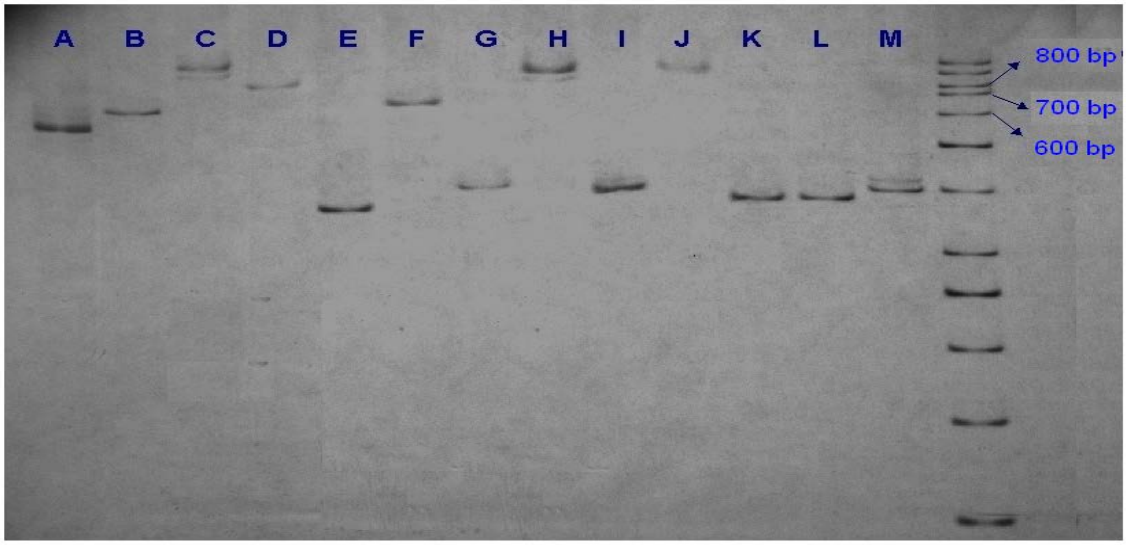
نتیجه حاصل از بررسی DNAهای استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که DNAهای استخراج شده دارای کمیت و کیفیت قابل قبولی برای استفاده در واکنش زنجیره پلی‌مراز هستند (شکل ۱). در روش اسپکتوفتومتر، میزان جذب در طول موج ۲۶۰nm و ۲۸۰nm با استفاده از دستگاه بیوفتومتر محاسبه شد. نمونه‌هایی که این نسبت برای آن‌ها در دامنه ۱/۸ تا ۲ قرار داشت قابل قبول و برای سایر نمونه‌ها استخراج مجدد انجام شد.



شکل (۱): تصویر مربوط به بررسی کیفیت DNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪

• شناسایی گونه‌های مورد بررسی

در این پژوهش، ۱۴ گونه گوشتخوار مورد بررسی قرار گرفتند که براساس نتایج حاصل از باندهای تشکیل شده روی ژل آکریل‌آمید کوچک‌ترین اندازه باند متعلق به دو گونه روباه و بزرگ‌ترین اندازه باند متعلق به گربه وحشی به دست آمد (شکل ۲). برای هر یک از گونه‌های مورد بررسی یک اندازه ویژه حاصل شد، تنها برای دو گونه روباه معمولی و شاه‌روباه اندازه باند یکسان بود و برای گونه کاراکال الگوی سه باندی تشکیل شد (شکل ۳). با توجه به نرخ بالای جهش‌پذیری ناحیه‌کنترل ژنوم میتوکندری، بین طول توالی‌های به‌دست آمده از این پژوهش با طول توالی‌های به دست آمده از ژن بانک تفاوت چندانی وجود ندارد (جدول ۳). اندازه باند نمونه مشکوک ۴۰۵bp (جفت باز) به‌دست آمد که براساس نتایج حاصل از این پژوهش به عنوان گونه گرگ شناسایی شد (شکل ۴).



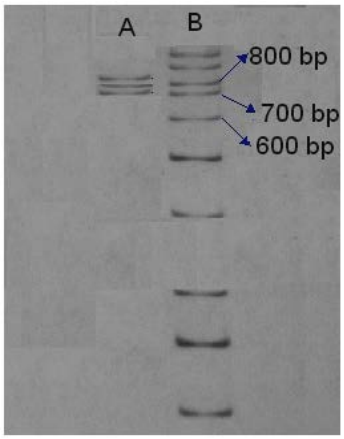
شکل (۲): تصویر باندهای ایجاد شده برای گونه‌های گوشت‌خوار بر روی ژل اکریل آمید: A- پلنگ، B- یوزپلنگ، C- گربه‌ِی وحشی، D- گربه‌ی جنگلی، E - گربه‌ی شنی، F- گربه‌ی خانگی، G- خرس قهوه‌ای، H- کفتار، I- سگ اهلی، J- شغال، K- شاه‌روباه، L- روباه معمولی، M- گرگ

بحث و نتیجه‌گیری

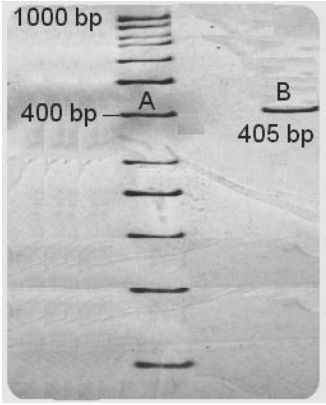
پلی‌مورفیسم طول در دامنه چپ ناحیه‌کنترل mtDNA و آنالیز اندازه قطعات تکثیر شده در ۱۴ گونه گوشت‌خوار بزرگ جثه به منظور شناسایی این گونه‌ها انجام گرفت. تفاوت در اندازه قطعات، این امکان را به‌وجود آورد که تفکیک و شناسایی برای اکثر گونه‌های مورد مطالعه عملی شود (Kitano et al., 2007). البته گونه کاراکال به دلیل الگوی خاص باندی که به صورت سه باندی بر روی ژل ظاهر شد، به صورت مجزا از سایر گونه‌ها در نظر گرفته شد. حضور بیش از یک باند در کاراکال را می‌توان به دلیل هتروپلاسمی دانست چرا که حضور سه کپی ۸۰۰ جفت‌باز تکراری و یک نسخه هسته‌ای از ناحیه‌کنترل ژنوم میتوکندری در گربه‌سانان رایج است (Scott Mills et al., 2000).

جدول (۳): طول توالی ناحیه کنترل میتوکندری به دست آمده برای گونه‌های مورد مطالعه

گونه	نام فارسی	اندازه باند به‌دست آمده (bp)	اندازه ثبت شده در ژن بانک (bp)
Panthera pardus	پلنگ	۵۵۶	۵۵۶
Acinonyx jubatus venaticus	یوز پلنگ	۵۵۲	-
Felis silvestris	گربه وحشی	۹۵۰	-
Felis chaus	گربه جنگلی	۸۰۰	-
Felis margarita	گربه شنی	۳۷۰	-
Felis catus	گربه خانگی	۶۵۰	۶۹۰
Ursus arctos	خرس قهوه‌ای	۴۰۹	۴۱۵
Hyena hyena	کفتار	۹۳۰	-
Canis lupus	گرگ	۴۰۵	۳۹۷
Canis lupus familiaris	سگ	۴۰۲	۳۸۹
Canis aureus	شغال	۹۳۵	-
Vulpes cana	شاه روباه	۳۸۹	-
Vulpes vulpes	روباه معمولی	۳۸۹	۳۷۳



شکل (۳): الگوی سه باندی کاراکال:
A- کاراکال، B-مارکر



شکل (۴): نمونه بافت مشکوک شناسایی شده:
A-مارکر، B-گرگ

همچنین، گونه‌های روباه و شاه‌روباه به دلیل یکسان بودن اندازه باند (۳۸۹ جفت باز) توسط آغازگر مورد استفاده در این مطالعه قابل تفکیک از یکدیگر نبودند. نتایج جستجوی توالی مورد مطالعه برای گونه‌های گوشت‌خوار مذکور که توسط بلاست کردن آغازگر انجام شد، نشان داد که برای اکثر این گونه‌ها، توالی مورد نظر ما ثبت نشده است. از بین ۱۴ گونه مورد مطالعه، فقط توالی شش گونه ثبت شده بود که اختلاف جزیی بین طول توالی‌های ژن‌بانک با نتایج ما می‌تواند به دلیل تغییرپذیری بسیار زیاد ناحیه‌کنترل باشد، با توجه به این که توالی‌های ثبت شده هیچ یک متعلق به جمعیت‌های ایران نیست. اندازه‌های ثبت شده طول توالی ناحیه کنترل میتوکندری در مطالعه حاضر (جدول ۳)، حکم کلید شناسایی ژنتیکی را برای گونه‌های مورد مطالعه در مناطقی که نمونه‌گیری در آن انجام شده را دارد. با توجه به این که توالی مذکور در اکثر گونه‌های گوشت‌خوار طول مخصوص به خود را داشت، با استفاده از یافته‌های این تحقیق شناسایی گوشت‌خواران بزرگ جثه از نمونه‌های ناشناخته زیستی بر اساس پلی‌مورفیسم طول ژن ناحیه‌کنترل میتوکندری با دقت و صحت بالا امکان‌پذیر است (Mitani et al., 2009). با روش ارایه شده در مطالعه حاضر، برای اولین بار در ایران شناسایی گونه‌های گوشت‌خوار از نمونه‌های مکشوفه و بدون داشتن اطلاعات قبلی میسر شد، یک نمونه بافت مشکوک که از متخلفان کشف شده

بود با موفقیت در این پژوهش شناسایی و نتایج حاصله به اداره کل محیطزیست جهت ارایه به دادگاه ارسال شد. نتایج حاصله کمک شایانی در زمینه جرم‌شناسی حیات‌وحش و برخورد با متخلفان شکار خواهد داشت. همچنین، می‌توان جهت مشخص کردن حضور و یا عدم حضور گونه‌های گوشت‌خوار در مناطق تحت حفاظت سازمان حفاظت محیطزیست که همیشه با ابهام مواجه بوده، با استفاده از نمونه‌های زیستی (مو، مدفوع، بافت، خون) یافته شده حضور، این گونه‌های کمیاب را با قطعیت مشخص کرد. به‌ویژه، در خصوص یوزپلنگ که در بحران انقراض قرار دارد و مشخص کردن زیستگاه‌های آن امری حیاتی در مدیریت این گونه و برنامه‌ریزی برای حفاظت آن است. در مورد گونه‌های شاه روباه و روباه معمولی که قابل تفکیک نبودند می‌توان با استفاده از آنزیم‌های برشی یا طراحی آغازگر جدید آن‌ها را شناسایی کرد. الگوی سه باندی ایجاد شده توسط کاراکال نیز می‌تواند کلید شناسایی برای این گونه باشد. زیرا، در میان تمامی گونه‌های مورد مطالعه منحصر به فرد بود. عدم حضور گونه‌های خرس سیاه، سیاه گوش، روباه ترکمنی و سایر گونه‌های نادر به دلیل عدم دسترسی به نمونه بافت قابل اغماض بود. بنابراین، ادامه نمونه‌برداری به صورت منسجم از زیستگاه‌ها و جمعیت‌های کشور علاوه بر شناسایی تعداد بیش‌تری از گونه‌ها می‌تواند کلید شناسایی ژنتیکی ارایه شده در تحقیق حاضر را به تمام کشور بسط دهد و صحت و اعتبار آن را جهت ارایه به مراجع قضایی تایید کند. شایان ذکر است، استفاده از پلی‌مورفیسم طول برای شناسایی گوشت‌خواران برای سرعت بخشیدن به مراحل کار و مقرون به صرفه بودن کاربرد این روش بود. بنابراین، استفاده از فن‌آوری‌های به روزتر و روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی برای ادامه تحقیق حاضر پیشنهاد می شود.

فهرست منابع

ضیایی، ه. ۱۳۸۸. راهنمای صحرایی پستانداران ایران. انتشارات کانون آشنایی با حیات‌وحش، ۴۲۰ص.

فیروز، ا. ۱۳۷۸. حیات‌وحش ایران. انتشارات مرکز نشر دانشگاهی با همکاری انتشاران دایره سبز، ۴۹۱ ص.

Balitzki-Korte, B.; Anslinger. K.; Bartsch, C. & Rolf, B. 2005. Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene. The International Journal of Legal Medicine, 119: 291-294.

Bardeleben, C.; Moore, R. & Wayne, R. 2005. A molecular phylogeny of the Canidae based on six nuclear loci. Molecular Phylogenetics and Evolution, 37: 815-831.

Bellis, C.; Ashton, K.J.; Freney, L.; Blair, B. & Griffiths, L.R. 2003. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. Forensic Science International, 134: 99-108.

Eisenberg, J.F. 1981. Life history strategies of the Felidae. In: Variations on a common theme, Douglas, S. and Everett, D.D. Eds. Natonal Wildlife Federation, Washington, D.C, 293-303 Pp.

Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. Biological Conservation, 126: 131-140.

Fumagalli, L.; Pope, L.C.; Taberlet, P. & Moritz, C. 1996. Versatile primers for the amplification of the mitochondrial DNA control region in marsupials. Molecular Ecology, 6: 1199-1201.

Gittleman, J.L. 1989. Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution. Cornell University Press, New yourk, 595p.

Imaizumi, K.; Akutsu, T.; Miyasaka, S. & Yoshino, M. 2007. Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA. The International Journal of Legal Medicine, 121: 184-191.

Kitano, T.; Umetsu, K.; Tian, W. & Osawa, M. 2007. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. The International Journal of Legal Medicine, 121: 423-427.

Mitani, T., Akane, A., Tokiyasu, T., Yoshimura, S., Okii, Y., and Yoshida, M. 2009. Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene. Legal Medicine, 11: 449-450.

Nakamura, H.; Muro, T.; Imamura, S. & Yuasa, I. 2009. Forensic species identification based on size variation of mitochondrial DNA hypervariable regions. The International Journal of Legal Medicine, 123: 177-184.

Parson, W.; Pegoraro, k.; Niederstätter, H.; Föger, M. & Steinlechner, M. 2000. Species identification by means of the cytochrome *b* gene. The International Journal of Legal Medicine, 114: 23-28.

Pun, K.M.; Albrecht, C.;, Castella, V. & Fumagalli, L. 2009. Species identification in mammals from mixed biological samples based on mitochondrial DNA control region length polymorphism. Electrophoresis, 30: 1008-1014.

Rastogi, G.; Dharne, M.S.; Walujkar, S.; Kumar. A.; Patole, M. S. & Shouche, Y.S. 2007. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. Meat Science, 76: 666-674.

Riddle, A.E.; Pilgrim, K.L.; Scott Mills, L.; McKelvey, K.S. & Ruggiero, L. F. 2003. Identification of mustelids using mitochondrial DNA and non-invasive sampling. Conservation Genetics, 4: 241-243.

Savolainen, P.; Arvestad, L. & Lundeberg, L. 2000. mtDNA Tandem Repeats in Domestic Dogs and Wolves: Mutation Mechanism Studied by Analysis of the Sequence of Imperfect Repeats. Molecular Biology and Evolution, 17 (4): 474-488.

Scott Mills, L.; Pilgrim, K.L.; Schwartz, M.K. & McKelvey, K. 2000. Identifying lynx and other North American felids based on MtDNA analysis. Conservation Genetics, 1: 255-288.

Taberlet, P.; Bouvet, J. & Proc. R. 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetic of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. The Royal Society, 1344: 195-200.

Williams, C. L. & Johnston, J. J. 2004. Using Genetic Analyses to Identify Predators. Sheep & Goat Research Journal, 19: 125-132.