مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

رهیافت مولکولی برای شناسایی زوج‌سمان بر اساس چند شکلی ناحیه کنترل میتوکندری

وحید زمانی[1]، حمیدرضا رضایی*[2]، سالومه بازیان[1]، سید محمود عقیلی[2]، علی شعبانی[2]، مرضیه اسدی‌آقبلاغی[3]، نوید زمانی[3]

[1] دانش‌آموخته مهندسی منابع طبیعی- محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان

[2] عضو هیات علمی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان

[3] دانش‌آموخته مهندسی منابع طبیعی- محیط زیست دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۰۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۰۷

چکیده

در سال‌های اخیر جمعیت گونه‌های زوج‌سم بواسطه شکار غیر قانونی کاهش چشمگیری داشته است. در بسیاری از موارد شناسایی اعضای بدن و بافت‌های کشف شده از شکارچیان متخلف از طریق مشاهده چشمی میسر نیست و این امر اثبات تخلف صورت گرفته را با مشکل مواجه می‌کند. هدف از تحقیق حاضر ارائه روشی ملکولی بر مبنای نشانگر متداول ژنوم میتوکندری و استفاده از آغازگرهای عمومی برای شناسایی هشت گونه از خانواده‌های گوزن‌ها، گاوها و گرازها است. به منظور اجرای این تحقیق نمونه‌های بافت هشت گونه زوج‌سم شامل: مرال (*Cervus elaphus maral*)، شوکا (*Capreolus capreolus*)، جبیر (*Gazella bennettii*)، آهو (*Gazella subgutturosa*)، گوزن زرد ایرانی (*Cervus dama mesopotamica*)، گراز (*Sus scrofa*)، پازن (*Capra aegagrus*) و قوچ اوریال (*Ovis vignei*) از جمعیت‌های وحشی مناطق مختلف مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد طول ناحیه کنترل میتوکندری (D-loop) در گونه‌های مورد مطالعه چندشکلی بالایی دارد (مرال ٥٦٩ جفت باز، شوکا جفت باز ٥٧٣، جبیر ٥٩٨ جفت باز ، آهو ٦٤٤ جفت باز ، گوزن زردایرانی ٥٧٨ جفت باز، گراز ٥٦٦ جفت باز ، پازن ٩٩٠ جفت باز و قوچ اوریال ١٠٦٢ جفت باز)، که بر این اساس تشخیص گونه‌ها به کمک این ویژگی امکان‌پذیر می‌باشد. به این ترتیب استفاده از این روش و ارایه مدارک ژنتیکی معتبر به دادگاه، تحولی در زمینه برخورد با تخلفات شکار به وجود خواهد آورد. همچنین، می‌توان حضور این گونه‌های کمیاب را در مناطق مختلف با قطعیت مشخص نمود و مطالعات بوم‌شناسی آن‌ها را بهبود بخشید.

کلمات کلیدی: *زوج سمان، ناحیه‌کنترل ژنوم میتوکندری، تخلفات شکار.*

---

* نویسنده مسئول: حمیدرضا رضایی تلفن: ٠٩١١٢٦٩١٦٢٤ Email: rezaei@gau.ac.ir

مقدمه

یکی از مهم‌ترین چالش ها در زمینه حفاظت از حیات وحش، آشنایی کامل با بوم‌شناسی گونه است. در این راستا شناسایی گونه‌ها در محیط زندگی آنها که نقش ویژه‌ای را در برآورد چگونگی وضعیت و متعاقب آن نرخ انقراض و یا ماندگاری گونه در طبیعت ایفا می‌کند، در الویت قرار دارد (Frankham, 2005). مشاهده و شناسایی بسیاری از گونه‌های وحشی به علت ویژگی‌های خاص رفتاری، مانند شب‌زی بودن، گونه‌های فراری، رنگ‌آمیزی استتاری با محیط، دشوار و در برخی موارد نیز با اشتباهاتی همراه است. روش‌های متفاوتی جهت شناسایی گونه‌های وحشی مانند روش مشاهده مستقیم و بررسی‌های آزمایشگاهی استفاده می‌شود. در گذشته اکثر روش‌های شناسایی مبتنی بر روش‌های ریخت‌شناسی بوده است. اما امروزه در بسیاری از مطالعات میدانی جهت شناسایی گونه‌های حیات‌وحش با بررسی تغییرات ژنتیکی به راحتی می‌توان اطلاعات با ارزشی در خصوص شناسایی گونه‌ها با استفاده از نمونه‌های غیرتهاجمی مانند پوست، مو، پر و خون به دست آورد (Imaizumi *et al*., 2007; Bellis *et al*., 2003; Balitzki *et al*., 2005; Riddle *et al*., 2003; Kitano *et al*., 2007). روش‌های مختلفی برای تشخیص گونه‌ها بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز وجود دارد، که شامل ایجاد آغازگرهای PCR خاص گونه و استفاده از آغازگرهای عمومی ترکیبی برای توالی‌های مشتق شده از سایر گونه‌ها است (Jarman *et al.,* 2004; Hill *et al*., 1996). در دهه‌های گذشته چندشکلی ژنوم میتوکندری اغلب به‌عنوان یک نشانگر زیستی مناسب برای ردیابی سلول‌های گیاهی و جانوری مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر آن ناحیه کنترل دارای قطعاتی است که چهار الی پنج بار سریع‌تر از کل DNA میتوکندریایی تکامل می‌یابد (Mitani et al., 2009; Reuter et al., 2009; Valentini et al., 2008).

ژنوم میتوکندری به دلیل دارا بودن تعداد زیادی نسخه میتوکندری در هر سلول و تغییرپذیری زیاد در طول توالی آن، به ابزاری قدرتمند برای شناسایی گونه‌ها تبدیل شده و کاربرد گسترده‌ای در شناسایی گونه‌های اهلی و وحشی مانند سگ و گرگ دارد (Asadi, 2012). همچنین توالی ناحیه کنترل این ژنوم در بسیاری از تاکسون‌های مطالعه شده نرخ تکاملی بالایی را نشان می‌دهد (Rastogi *et al*., 2007; Taberlet *et al*., 1999; Hebert *et al*., 2002; Tautz *et al*., 2003).

راسته زوج سمان شامل پستانداران اهلی و وحشی است، که سه خانواده گراز، گوزن و گاو در ایران وجود دارند. گونه‌های این خانواده‌ها شامل گراز، گوزن زرد، مرال، شوکا، آهو، جبیر، بز (پازن)، قوچ و میش‌های اوریال و ارمنی هستند، که اغلب به صورت اجتماعی زندگی می‌کنند. در بسیاری از مناطق کشور به علت تعقیب و شکار بی‌رویه، تخریب زیستگاه و اشغال آبشخورها به وسیله دام‌های اهلی، جمعیت آن‌ها

به شدت دچار کاهش شده و خطر انقراض نسل این موجودات را تهدید می‌کند (Firoz, 1999; Ziaie, 2009). بنابراین مطالعه و شناسایی دقیق این گونه‌های در معرض خطر، لازمه تدوین و اجرای برنامه‌های حفاظتی است. بسیاری از گونه‌های زوج سمان به خصوص در زیستگاه‌های جنگلی دارای ویژگی‌های رفتاری خاص مانند فرار و استتار هستند، لذا تصمیم‌گیری در مورد اصولی‌ترین اقدامات حفاظتی برای آن‌ها سخت و یا غیر ممکن است (Riddle *et al.*, 2003). از سویی دیگر اقدامات قانونی و خدمات مدیریت حیات‌وحش ممکن است به تشخیص نمونه‌های گیاهی یا جانوری که بر اثر کشتارهای انسانی، شکار غیرقانونی و تجارت گونه‌های حمایت شده، تصادفات جاده‌ای حیوانات و جستجوهای تغذیه‌ای به دست آمده، نیاز داشته باشند. چنانچه بسیاری از مراکز فعال در زمینه حفاظت حیات‌وحش در اثبات جرم و برخورد با افراد متخلف با مشکل مواجه هستند. در این تحقیق سعی بر آن است به کمک یک جفت آغازگر عمومی، چندشکلی طول ژن ناحیه‌کنترل میتوکندری تعیین گردد تا روشی قابل اعتماد، مقرون به صرفه و سریع برای شناسایی نمونه‌های مختلط یا ناشناخته و نمونه‌های کشف شده از متخلفین شکار ارائه گردد (Sugimoto *et al.*, 2006).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در پژوهش حاضر از گونه‌های، گراز (*Sus scrofa*)، بز و پازن (*Capra aegagrus*)، مرال (*Cervus elaphus maral*)، گوزن‌زرد ایرانی (*Cervus dama mesopotamica*)، شوکا (*Capreolus capreolus*)، قوچ اوریال (*Ovis vignei*)، آهو (*Gazella subgutturosa*) و جبیر (*Gazella bennettii*) از نمونه‌های به دست آمده از تخلفات شکار و تلفات جاده‌ای نمونه بافت تهیه شد (جدول ۱). نمونه‌های بافت ابتدا در الکل قرار داده شدند و پس از ۲٤ ساعت به تیوب‌های حاوی سیلیکاژل منتقل گردید.

آماده سازی نمونه‌ها

استخراج DNA از نمونه های بافت با استفاده از کیت (AccuPower® PCR PreMix kit, Bioneer) 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.

جدول ١- فهرست نمونه‌های استفاده شده در این مطالعه.

Table1: List of samples used in this study.

تعداد نمونه **Number of sample**	نوع بافت **Type of tissue**	محل نمونه **Place of sample**	نام علمی **Scientific name**	نام فارسی **Persian name**
1	بافت Tissue	خراسان رضوی Razavi Khorasan	*Gazella bennettii*	جبیر Jebir
4	بافت Tissue	خراسان رضوی Razavi Khorasan	*Gazella subgutturosa*	آهو Gazelle
2	بافت Tissue	گلستان Golestan	*Capreolus capreolus*	شوکا Roe Deer
4	بافت Tissue	گلستان Golestan	*Cervus elaphus maral*	مرال Maral Deer
5	بافت Tissue	مازندران Mazandaran	*Cervus dama mesopotamica*	گوزن زرد ایرانی Iranian Fallow deer
5	بافت Tissue	گلستان Golestan	*Sus scrofa*	گراز Wild Boar
6	بافت Tissue	گلستان، کرمانشاه Golestan, Kermanshah	*Capra aegagrus*	پازن Wild Goat
7	بافت Tissue	خراسان شمالی، گلستان Golestan, North Khorasan	*Ovis vignei*	قوچ اوریال Wild Sheep

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و الکتروفورز

به منظور بررسی چندشکلی توالی ناحیه کنترل در زوج سمان قطعه چپ ناحیه کنترل mtDNA توسط آغازگر پیشرو L15995 (Taberlet et al., 1994) و H16498 آغازگر پسرو (Fumagalli et al., 1996) تکثیر شد (جدول ۲). تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰ نانوگرم DNA یک واحد بین اللملی tap 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 ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری عبارت بود از: ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه، شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ٥٤ درجه و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه و بسط نهایی با ۷۲ درجه در ۵ دقیقه. سپس محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز ۲ درصد و ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد جدا سازی شدند. 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[1] به طور دقیق ثبت گردید. قابل ذکر است که بعد از تشکیل باند بر روی ژل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تهیه ژل برای هر گونه پنج بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل نتایج

توالی ناحیه‌کنترل ژنوم میتوکندری گونه‌های مورد استفاده ثبت شده در پایگاه ژن بانک از طریق بلاست[2] کردن با آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش در ژن‌بانک[3] جستجو شدند. مرتب‌سازی ردیف توالی‌ها با استفاده از آلاینمنت[4] در نرم‌افزار مگا[5] (با حدود اطمینان ٪۹۵) صورت گرفت و سپس طول توالی‌ها اندازه‌گیری شد. در نهایت طول توالی‌های بدست آمده از گونه‌های ثبت شده در ژن بانک با طول توالی‌های بدست آمده در این پژوهش مقایسه شدند.

نتایج

شناسایی گونه‌های مورد بررسی

در پژوهش حاضر هشت گونه زوج سم مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده

[1] DNA Ladder

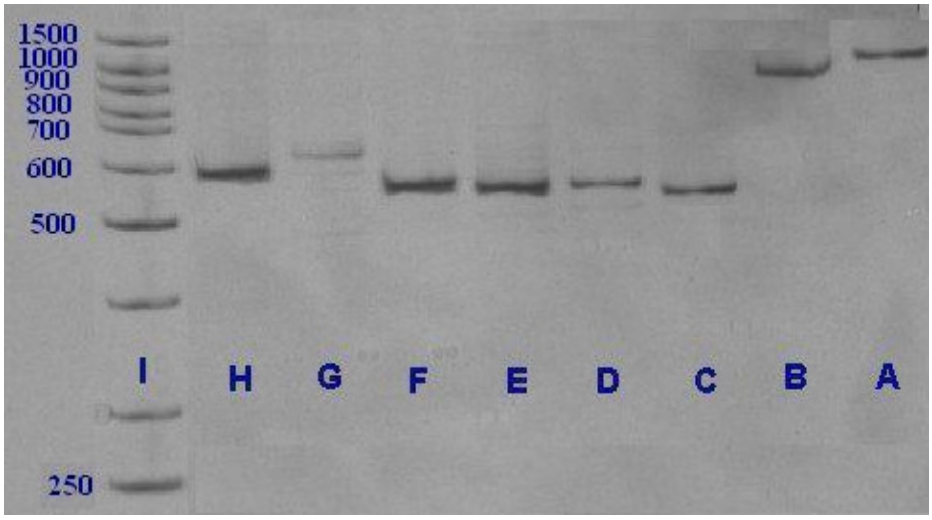
[2] BLAST
[3] National Center for Biotechnology Information
[4] Alingment
[5] MEGA5

نشان می‌دهد که هر یک از قطعات تکثیر شده ناحیه کنترل میتوکندری بر اساس چگالی و با توجه به طول مخصوص، جایگاهی ویژه‌ای را در روی ژل پلی‌اکریل‌آمید به خود اختصاص می-دهند (شکل ١). چنانکه اندازه طول توالی تکثیر شده ژن ناحیه‌کنترل میتوکندری در نمونه‌های مورد استفاده متفاوت بوده و هر کدام طول باند ویژه‌ای را بر روی ژل ایجاد کردند. اطلاعات حاصل از مقایسه اندازه‌گیری طول باندها بدست آمده با نمونه‌های مشابه موجود در ژن بانک اختلاف بارزی را در طول قطعه ناحیه‌کنترل ژنوم میتوکندری در بین گونه‌های مختلف و حتی در جمعیت‌های مختلف یک گونه نشان داد (جدول ٣).

جدول ٢- توالی‌ها آغازگرهای مورد استفاده ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری در این مطالعه.

Table 2: Sequences of the primers of mitochondrial control region used in this study.

آغازگر Primer	جایگاه ژنی Loci
F-5´CTCCACTATCAGCACCCAAAG-3´ R-5´CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3´	D-LOOP



شکل ١- تصویر باندهای ایجاد شده برای گونه‌های زوج‌سم بر روی ژل اکریل آمید. A-*Ovis vignei*، B-*Capra aegagrus*، C-*Sus scrofa*، D-*Cervus dama mesopotamica*، E-*Cervus elaphus*، F-*Capreolus capreolu*، G-*Gazella subgutturosa*، H-*Gazella bennettii*، I- Lader.

Figure 1- Image created for species artiodactyls bands on polyacrylamide gel: A-*Ovis vignei*, B-*Capra aegagrus*, C-*Sus scrofa*, D-*Cervus dama mesopotamica*, E -*Cervus elaphus*, F-*Capreolus capreolu*, G-*Gazella subgutturosa*, H-*Gazella bennettii*, I- Lader.

جدول ۳- طول توالی ناحیه کنترل میتوکندری بدست آمده برای گونه‌های مورد مطالعه و گونه‌های موجود در پایگاه ژنبانک.

Table 3- The mitochondrial control region length obtained for the species studied and species at the base NCBI.

طول باند بدست آمده Length of band obtained	نام علمی Scientific name	
598 bp	*Gazella bennettii*	گونه‌های مورد مطالعه Species studied
644 bp	*Gazella subgutturosa*	
573 bp	*Capreolus capreolus*	
569 bp	*Cervus elaphus maral*	
578 bp	*Cervus dama mesopotamica*	
566 bp	*Sus scrofa*	
990 bp	*Capra aegagrus*	
1062 bp	*Ovis vignei*	
479 bp	*Cervus elaphus*	گونه‌های موجود در پایگاه ژنبانک Species at the base NCBI
554 bp	*C. elaphus songaricus*	
993 bp	*C. elaphus xanthopygus*	
480 bp	*C. elaphus yarkandensis*	
876 bp	*Ovis vignei*	
800 bp	*O. orientalis anatolica*	
477 bp	*Cervus dama*	

بحث

در مطالعه حاضر بر اساس اختلاف طول ژن ناحیه‌کنترل میتوکندری، شناسایی گونه‌های خانواده گراز، گاوسانان و گوزن‌سانان صورت گرفت. اندازه‌های ثبت شده طول توالی ناحیه‌کنترل میتوکندری در مطالعه حاضر نشان داد که از این ویژگی میتوان به عنوان یک کلید شناسایی ژنتیکی معتبر برای تشخیص گونه‌های مورد مطالعه سود برد. در واقع با توجه به این اختلافات طول ناحیه‌کنترل در گونه‌های مختلف و همسانی در بین افراد یک گونه، می‌توان با دقت بالایی به شناسایی گونه اقدام نمود. البته در گونه شوکا و مرال در طول چندشکلی قطعه مورد نظر اختلاف زیادی مشاهده نشد. در چنین مواردی پیشنهاد می‌گردد که از آنزیم‌های برش دهنده، زوج پرایمر متفاوت و یا توالی دیگری برای این منظور استفاده گردد (Pun *et al.*, 2009). تفاوت طول قطعه میان داده‌های ژن‌بانک و داده‌های بدست آمده از این پژوهش قابل پیش‌بینی بود به دلیل اینکه که نمونه‌های موجود در ژن‌بانک هیچ

کدام متعلق به ایران نبود و چندشکلی در طول توالی تکثیر شده میان نمونه‌های مورد آزمایش با نمونه‌های ثبت شده در ژن‌بانک قابل انتظار بود. با استفاده از یافته‌های این تحقیق شناسایی زوج‌سمان از نمونه‌های ناشناخته بر اساس چندشکلی طول ژن ناحیه‌کنترل میتوکندری با دقت و صحت بالا امکان‌پذیر است. لذا با در اختیار داشتن نمایه‌های بیولوژیک (خون، بافت، ادرار، بزاق و مدفوع) می‌توان گونه‌های غیر قابل تشخیص که بر اثر تصادفات جاده‌ای، حملات و تلفات طبیعی، جستجوهای تغذیه‌ای و یا کشف نمونه از متخلفین به دست آمده‌اند را شناسایی کرد. در موارد جرم‌شناسی حیات‌وحش نیز می‌توان با اطمینان کامل از صحت نتایج، هزینه پایین و سرعت بالا گامی موثر در کاهش تخلفات و بررسی هرچه سریع‌تر وضعیت گونه‌ها برداشت (Pun *et al.*, 2009) و اقدام به شناسایی گونه‌ها نمود. با نتایج این تحقیق مدراک مستند و موثق در اختیار دادگاه قرار می‌گیرد و امید است که تحولی در کاهش تخلفات شکار ایجاد نماید. کما اینکه در طی این پژوهش چهار نمونه بافت مکشوفه از متخلفان شکار از استان گلستان، یک نمونه از مازندران، یک نمونه از کرمانشاه و یک نمونه از خراسان رضوی با موفقیت شناسایی شد. قابل ذکر است که روش مذکور در شناسایی مناطق نمونه‌برداری نیز موثر است و بر اساس این نتایج، مناطق شکار نمونه‌های به دست آمده نیز قابل شناسایی است. چنانکه این روش در شناسایی گونه‌های گوشت‌خوار بویژه گونه‌های در معرض خطر مانند یوزپلنگ و برخورد با متخلفین نیز بکار می‌رود (Zamani, 2012). با استفاده از نمونه‌های زیستی یافته شده در مناطق مختلف می‌توان حضور گونه‌های کمیاب بویژه گونه‌هایی که از نظر حفاظتی در وضعیت انقراض قرار دارند و اثبات حضور آن‌ها در منطقه می‌تواند رهگشای مدیریت اکوسیستم‌ها و مشخص کردن زیستگاه‌های مورد استفاده آن‌ها باشد، استفاده کرد.

همچنان که در تمامی زمینه‌های علوم از جمله بوم‌شناسی نارسایی‌هایی در سطوح مختلف همانند عدم امکانات، ناکافی بودن اطلاعات و بویژه کمبود نمونه‌های وحشی جهت پژوهش‌های آزمایشگاهی به چشم می‌خورد. در زمینه تحقیق درخصوص DNA میتوکندری نیز این نقایص و اشتباهات آشکار است که می‌تواند ناشی از تغییرات پایه‌ای، جهش‌های غیر واقعی، اشتباهات پایه و نوترکیبی مصنوعی باشد (Yao *et al.*, 2004). این گونه ابهامات با بکارگیری روش‌های مکمل مانند توالی‌یابی DNA، تحلیل‌های تکامل نژادی و مقایسه با توالی‌های مرتبط و متشابه از پایگاه اطلاعاتی دیگر می‌تواند شناسایی و رفع گردد. لذا با توجه به محدودیت‌هایی که ذکر گردید، روش ارائه شده در این مطالعه به دلیل استفاده از یک جفت آغازگر و عدم توالی‌یابی با کمترین زمان، هزینه و امکانات آزمایشگاهی بصورت متداول در اکثر آزمایشگاه‌ها قابل اجراست و نتایج قابل تکرار آن می‌تواند مورد استفاده محققین بوم‌شناسی جمعیت حیات‌وحش

و همچنین سازمان‌های فعال در زمینه حفاظت محیط زیست، مراکز قضایی و سایر نهادهای مربوطه قرار گیرد.

منابع

Asadi M (2012). Gene flow between wolf and dog using mitochondrial DNA (mtDNA) and Y chromosome microsatellite (SSRs) markers in Hamedan Province. Faculty Natural Resources. Thesis MSc.Tehran University. Pp 100.

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.

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

Firoz E (1999). Wild life of Iran. Center of university press. Pp 491.

Frankham R (2005). Genetics and extinction. Biological Conservation. 126: 131–140.

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

Hillis D. M, Moritz C, Mable B. K. Eds (1996). Molecular systematics 2nd edn, Vol. 23. Sinauer Associates Inc., Sunderland. 396p.

Hebert P. D, Cywinska A, Ball S. L, Waard J. R (2002). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B 270: 313–321.

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.

Jarman S. N, Deagl B. E, Gales N. J (2004). Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. Molecular Ecology 13: 1313–1322.

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. A, Akane T, Tokiyasu S, Yoshimura Y., Yushida M. (2009). Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene. Legal Mediciine. Legal Medicine 11: 449-450.

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: 1–7.

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.

Reuter T, Xu W, Alexander TW, Stanford K, Xu Y, McAllister T. A (2009). Purification of polymerase chain reaction (PCR)-amplifiable DNA from compost piles containing bovine mortalities. Bioresource Technology 100: 3343–3349.

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

Sugimoto T, Nagata J, Aramilev V. V, Belozor A, Higashi S, McCullough D. R. (2006). Species and sex identification from faecal samples of sympatric carnivores, Amur leopard and Siberian tiger, in the Russian Far East. Conservation Genetics 7: 799–802.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas R. H, Vogler A. P (2003). A plea for DNA taxonomy. Trends in Ecology and Evolution 18: 70–74.

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.

Taberlet P, Waits L, Luikart G (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends in Ecology and Evolution. 14: 323–327.

Valentini A. Miquel C, Nawaz M. A, Bellemain E. V. A, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Cruaud C, Nascetti G, Wincker P, Swenson J, Taberlet P (2008). New perspectives in diet analysis based on DNA bar coding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. Molecular Ecology Resources 9(1): 51-60.

Yao Y. G, Bravi C. M, Bandelt H. J (2004). A call for mtDNA data quality control in forensic science. Forensic Science International 141: 1–6.

Zamani V (2012). Species identification in large carnivores based on mitochondrial DNA length polymorphism. Thesis MSc. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Faculty of Fisheries and Environment. Pp. 100.

Ziaie H (2009). Field Guide to Mammals of Iran. Press Association with wildlife Pp: 420. In Farsi.

Approach of molecular technique to identify Artiodactyls based on mitochondrial D-loop polymorphism

Zamani V.[1], Rezaei H.R.[*2], Bazyan S.[3], Aghili S.M.[2], Shabani A.[2], Asadi Aghbolaghi M.[3], Zamani N.[3]

[1] Master of Environmental Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[2] Scientific member, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[3] Master of Environmental Science, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Abstract

In recent year species of Artiodactyla have suffered rather decrease in populations as result of poaching. In many cases detecting the organs and tissues obtained from arrested poachers is not possible visually therefore it makes difficult to affirm the occurred violation. The aim of this study was to provide a molecular technique based on mtDNA marker and universal primer for indentifying 8 species of Cervidae, Bovidae and Suidae families. Tissues samples of eight ungulate species (*Cervus elaphus maral*, *Capreolus capreolus, Gazella bennettii*, *Gazella subgutturosa*, *Cervus dama mesopotamica*, *Sus scrofa, Ovis vignei*, *Capra aegagrus*) from different wild populations were examined and identified. The results showed that the mitochondrial control region (D-loop) is highly polymorphic in these species (*Cervus elaphus maral* 569 bp, *Capreolus capreolus* 573 bp, *Gazella bennettii* 598 bp, *Gazella subgutturosa* 644 bp, *Cervus dama mesopotamica* 578 bp, *Sus scrofa* 566 bp, *Ovis vignei* 1062 bp, *Capra aegagrus* 990 bp). Accordingly Identification of species from tissues is accessible by this technique. The advantage of this technique is to make genetic evidence for the courts concerning poaching violations. In addition by means of this technique could discover the presence of the rare species in wide habitats which improves their ecological studies.

Keywords: *Artiodactyla, mtDNA control region, poaching violations.*

[*] Corresponding Author: Rezaei H.R. Tel: 09112691624 Email: rezaei@gau.ac.ir