

مروری



روش‌های بارکدگذاری DNA در تعیین رژیم غذایی مهره داران، چالش‌ها و محدودیت‌ها

صیاد شیخی ئیلانلو^{۱*}، حمید رضا رضایی^۲، صالح محمودی^۲

^۱گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران
^۲گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

برای تعیین رژیم غذایی در مهره‌داران روش‌های گسترده‌ای پیشنهاد شده است. بارکدگذاری DNA - استفاده از ناحیه استاندارد شده DNA برای شناسایی تاکسون - اخیراً مورد توجه زیادی قرار گرفته است و در زمینه بین‌المللی توسعه پیدا کرده است. بارکدگذاری DNA این امکان را به وجود می‌آورد تا بتوان رژیم غذایی یک فرد را از روی مدفوع یا محتویات معده آن تعیین کرد. در حال حاضر تکنیک توالی‌یابی نسل بعد مناسب‌ترین تکنیک توالی‌یابی DNA گونه‌های طعمه و طعمه‌خوار هدف می‌باشد. البته تجزیه و تحلیل‌های مولکولی سرگین‌ها نیز با کاستی‌هایی روبرو می‌باشد. به طوری که DNA مدفوع می‌تواند دارای کمیت و کیفیت پایینی باشد، و تخریب نمونه مدفوع نیز می‌تواند مشکلی در مطالعه رژیم غذایی با استفاده از این رویکرد باشد. با وجود محدودیت‌های موجود تکنیک‌های مولکولی رویکرد جایگزینی را برای مطالعه رژیم غذایی جانوران فراهم کرده است. از این رو رویکردهای مبتنی بر DNA شاید مناسب‌ترین راه برای بررسی محدوده و تنوع طعمه گرفته شده توسط طعمه‌خواران عمومی باشد. شناسایی ژنتیکی از سرگین‌ها می‌تواند تجزیه و تحلیل‌های صحیح از رژیم غذایی، حل مشکلات مهره‌داران نزدیک احشام و زیستگاه‌های انسانی، و کمک به طراحی پناهگاه‌های حیات‌وحش و کریدورهای حیات‌وحش را فراهم نماید.

کلمات کلیدی: ژنتیک، پرندگان، پستانداران، خزندگان، حفاظت، رژیم غذایی

نویسنده مسئول: صیاد شیخی ئیلانلو
پست الکترونیک: sayyad.sheykhi@ut.ac.ir

مقدمه

از آن استفاده کنند همچنین برای شناسایی جوامع گونه‌ها از نمونه‌های محیطی می‌توان استفاده کرد. آن‌ها قادر به ارزیابی تنوع زیستی محلی آب و خاک هستند و می‌توانند ترکیب رژیم غذایی را با استفاده از نمونه‌های دفعی تخمین بزنند (Valentini, 2008). برای تعیین رژیم غذایی مبتنی بر بارکدگذاری DNA از نمونه‌های محیطی مختلفی استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به نمونه‌های سرگین،

بارکدگذاری DNA استفاده از ناحیه استاندارد شده DNA برای شناسایی تاکسون - اخیراً مورد توجه زیادی قرار گرفته است و در زمینه بین‌المللی توسعه پیدا کرده است. پیش بینی می‌شود که تکنیک‌های بارکدگذاری DNA توسط اکولوژیست‌ها به طور فزاینده‌ای استفاده شود. آن‌ها قادر هستند نه تنها برای شناسایی تک گونه‌ها از بین جوامع باقی مانده

مشخص شد، که اجزای گیاهی رژیم غذایی خرس قهوه‌ای اروپایی را به وسیله PCR و توالی‌یابی ژن rbcL از مدفوع‌های این گونه شناسایی نموده‌اند. اخیراً از DNA همانندسازی شده توسط PCR از مدفوع ۱۱۰۰۰ ساله برای مطالعه رژیم غذایی پستانداران تنبل منقرض شده و از مدفوع‌های ۲۰۰۰ ساله برای رژیم غذایی انسان‌ها استفاده شده است (Jarman *et al.*, 2002). DNA استخراج شده از مدفوع به جا مانده از حیوانات منقرض شده امکانی را برای شناسایی و مطالعه ژنتیکی آن‌ها در گذشته را فراهم نموده و جنبه‌هایی از رژیم غذایی آن‌ها را نشان می‌دهد (Poinar *et al.*, 2001). مقادیر زیادی از مواد مدفوع باقی مانده از سالیان خیلی زیاد با منشاء انسانی طی کاوش‌های باستان‌شناسی، به ویژه در غارهای خشک و پناه صخره‌ها یافت شده است. یک محل به نام غار هایندز (Hinds)، در حاشیه شرقی کویر چای‌هواهان (Chihuahuan) در جنوب غربی تگزاس واقع شده است، که در آن بیش از هزار مدفوع ذخیره شده انسان طی یک حفاری در سال ۱۹۷۴ یافت شد (Poinar *et al.*, 2001). بقایای باقی مانده بسیار با ارزش هستند زیرا آن‌ها دیدگاه‌هایی را از رژیم غذایی، رفتار جانوران و گیاهان موجود در اواخر دوره پلیستوسن ارائه می‌دهند (Hofreiter *et al.*, 2000).

تکنیک‌های مولکولی رویکرد جایگزینی را برای مطالعه رژیم غذایی جانوران فراهم کرده است. لذا، رویکردهای مبتنی بر DNA شاید مناسب‌ترین راه برای بررسی محدوده و تنوع طعمه گرفته شده توسط طعمه‌خواران عمومی باشد. از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) توالی‌های DNA منحصر

محتویات معده و روده، ریمه و پلت جانوران اشاره کرد.

نمونه‌های فضولات

شبکه مواد غذایی مهره‌داران اغلب نشان‌دهنده فعل و انفعالات میان طعمه‌خوار- طعمه می‌باشد، که شامل مشاهدات میدانی نسبتاً آسان است. اگرچه این موضوع در میان بی‌مهرگان بسیار نادر است. استفاده از روش‌های مولکولی برای مشخص کردن مسیرهای تغذیه‌ای مرموز در بی‌مهرگان، اغلب شامل آزمایشات مبتنی بر تغذیه آزمایشی و کشته شدن تعداد زیادی از نمونه‌ها می‌باشد. بنا بر دلایل اخلاقی و حفاظتی این روش برای مهره‌داران قابل قبول نیست لذا در این راستا برای مهره‌داران روش‌های جایگزین مانند: تجزیه و تحلیل مدفوع توسعه یافتند. بسیاری از تجزیه و تحلیل‌های مواد مدفوعی در ژنتیک جمعیت برای صفات فیلوژنتیکی جانوران بوده است که از مدفوع بدست آمده است. برای شناسایی گونه‌های دفع کننده مدفوع، سلول‌های مخاطی دیواره تحتانی روده برای استخراج DNA از مدفوع مورد هدف قرار می‌گیرد. برای تعیین ترکیب مواد غذایی خورده شده نیز سرگین‌های طعمه-خواران شناسایی می‌شود؛ و قسمت‌های سخت باقی-مانده طعمه برای تجزیه و تحلیل زنجیره‌ غذایی و گونه طعمه‌خوار استفاده می‌شود، اما وقتی باقی‌مانده طعمه برای بررسی مورفولوژیکی بیش از حد تخریب شود تعیین DNA طعمه از نمونه‌های مدفوع یک روش بسیار مناسب می‌باشد.

پتانسیل استفاده از شاخص‌های DNA برای شناسایی گونه‌های طعمه موجود در مواد مدفوعی برای نخستین بار به وسیله آقای Hoss و همکاران

گروهی برای تکثیر بخشی از ناحیه 12S DNA میتوکندریایی از مدفوع پرندگان استفاده شده است (Sutherland, 2000). محصولات PCR کلون شده (۱۶۵ جفت‌باز) چرخ‌ریسک سرآبی (*Parus caeruleus*) و چرخ‌ریسک بزرگ (*Parus major*) توسط تجزیه و تحلیل RFLP، توالی‌یابی و برنامه جستجوی BLAST برای تعیین رژیم غذایی این گونه‌های نزدیک به هم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل مدفوع تنها روش غیر تهاجمی برای شناسایی طعمه‌های خورده شده نیست. ریمه‌های برگردانده شده توسط پرندگان شکاری نیز می‌تواند برای DNA طعمه‌ها مورد هدف قرار گیرد (Jarman et al., Taberlet and Fumagalli, 1996). استخوان‌های پستانداران کوچک در پلت جغد می‌تواند منبعی برای تکثیر DNA هسته‌ای یا میتوکندریایی باشد (Taberlet and Fumagalli, 1996).

اگرچه انجام مطالعات غیرتهاجمی رژیم غذایی مهره‌داران مطلوب می‌باشد، روش تهاجمی در مقیاس بزرگ نیز گاهی اوقات انجام شده است. به عنوان مثال می‌توان به مطالعه کاکایی گلائوکوس اشاره نمود، کاکایی گلائوکوس (*Larus hyperboreus*) یک طعمه‌خوار شناخته شده برای جوجه‌های پرندگان کنارآبزی مختلف می‌باشد. در این مطالعه نمونه‌برداری از جمعیت مورد نظر کاکایی با استفاده از شکار آن‌ها به وسیله تفنگ شکاری صورت گرفت، و با استفاده از جایگاه ریز-ماهواره نشان داده شد که گونه نادر اردک عینکی (*Somateria fischeri*) یک طعمه مهم برای این گونه نیست ولی گونه غاز امپراتور (*Chen*

به فرد طعمه، شناسایی شده و می‌تواند حتی در نمونه‌های بسیار تخریب شده مانند آن‌هایی که در مدفوع، محتویات روده یا پلت یافت می‌شوند، به دست آید. این روش اخیراً برای طیف وسیعی از گروه‌های طعمه‌خوار از جمله: مهره‌داران دریایی (Jarman et al., 2002; Jarman and Wilson, 2004; Deagle et al., 2005; Parson et al., 2005; Barnett et al., 2010; Deagle et al., 2010; Dunn et al., 2010) پرندگان دریایی (Pegard et al., 2007 and 2010)، علف‌خواران (al., 2009; Soininen et al., 2009; Ray et al., 2011; Brown et al., 2012)، خزندگان (Bamran et al., 2012) و در مطالعات گسترده‌تر اکولوژی تغذیه به کار برده شده است (Zeale et al., 2011).

Jarman و همکاران (۲۰۰۲) از آغازگرهای اختصاصی-گروهی برای تکثیر نواحی زیر واحد کوچک (SSU) و زیر نواحی بزرگ (LSU) مولکول rDNA به ترتیب برای نهنگ آبی کوتوله (*Balaenoptera musculus*) و پنگوئن آدلاید (*Pygoscelis adeliae*) به واسطه مدفوع استفاده کردند. برای تکثیر کرپل‌ها ژنوم میتوکندری با استفاده از آغازگرهای اختصاصی کرپل مورد هدف قرار داده شد سپس DNA گونه‌های مختلف بر اساس اندازه و بر روی ژل در الکتروفورز جدا شد. پس از انجام PCR، منبع کلون ایجاد شده و توالی‌ها با توالی‌های موجود در ژن بانک و با استفاده از برنامه BLAST مقایسه شد.

در اکوسیستم‌های خشکی نیز با تجزیه و تحلیل مولکولی ترکیب رژیم غذایی به واسطه سرگین‌ها مشخص می‌شود. آغازگرهای PCR اختصاصی-

است که در آن الگوهای DNA هدف تجزیه شده و نیازمند تقویت مضاعف PCR می باشد.

محدودیت های روش های مبتنی بر DNA

تجزیه و تحلیل های مولکولی مدفوع ها نیز دارای کاستی هایی است، به طوری که DNA مدفوع نمونه برداری شده می تواند دارای کمیت و کیفیت پایینی باشد (Farrel et al., 2000) که این موضوع می تواند مشکلی در مطالعه رژیم غذایی با استفاده از این رویکرد باشد. به عنوان مثال در مطالعه Farrel و همکاران ۶۶ درصد سرگین های جمع آوری شده در فصل خشک دارای توالی های سالم بودند، در حالی که تنها ۲۸ درصد از نمونه های جمع آوری شده در فصل مرطوب توالی موفق برای شناسایی داشتند. همچنین یک نمونه سرگین جمع آوری شده در فصل بارانی شامل موی گاو به شدت کپک زده بود که DNA های آن تخریب شده و قابل استخراج نبود. یک (Foran et al., 1997; Farrel et al., 2000).

در مطالعه ای نشان داده شد که DNA حشرات طعمه از فضولات کلاغ ابلق می تواند حدود ۳۰ تا ۲۴۰ دقیقه پس از مصرف طعمه تکثیر شود. مقایسه این زمان انتقال DNA طعمه با بخش های سخت و زمان گیر انتقال روده نشان می دهد که این به طور قابل ملاحظه ای می تواند با توجه به نوع پرنده و انواع مواد غذایی مختلف، متفاوت باشد. برای مثال در سسک دمگاه زرد (*Dendroica coronata*) میانگین زمان ماند به ترتیب برای میوه، حشره و دانه برابر با ۴۶، ۶۲ و ۱۱۴ دقیقه در رژیم غذایی بود. مدت زمان انتقال در پرنده آوازخوان پالوستین (*Nectarinia osea*) حدود ۱۰ تا ۶۰ دقیقه بسته به

یک طعمه مهم برای این گونه بود. این یک برنامه مطالعه ریزماهواره بود که هدف معمول آن مطالعه ژنتیک جمعیت با گونه ها بود. گاهی اوقات چنین برنامه های مربوط به مطالعات طعمه-طعمه خوار کاربردی می باشد، برای مثال از ریز-ماهواره برای نشان دادن طبیعت غیرانتخابی خوردن تخم و نابالغین به واسطه روده در نوعی ماهی آب شیرین (*Etheostoma olmstedii*) استفاده شد.

با وجود اینکه مطالعات پیشین ثابت کرده اند که DNA طعمه می تواند با استفاده از PCR از مدفوع جدا شده و تقویت شود. این موضوع در نمونه های مدفوع خفاش خون آشام به دلیل عدم وجود بافت های قوی و غلظت بالای ترکیبات هموگلوبینی باز-دارنده PCR دچار مشکل می باشد. مقاومت بافت طعمه به هضم عامل تعیین کننده ای است که DNA مدفوع هدف تا چه حدی تخریب شده است. تجزیه و تحلیل های مبتنی بر PCR موفق گذشته بر روی نمونه های مدفوع مهره داران دارای رژیم غذایی پیچیده با بافت نسبتاً قوی مانند گیاهان، سخت-پوستان، حشرات، ماهی ها و سرپایان (گروهی از آبزیان دریایی) وجود دارند، که برخلاف محتویات خون، بافت مقاومی برای حفاظت DNA در فرآیند هضم دارند. کاستی های DNA با توجه به میزان هضم و تجزیه و تحلیل های موفق مبتنی بر PCR پیشین با استفاده از مواد خونی به آسانی تقویت می شوند. همچنین، مدفوع های خفاش خون آشام به مقدار زیادی ترکیبی از ترکیبات هموگلوبین است که نتیجه هضم هم زمان هموگلوبین پستانداران و پرندگان است؛ این ترکیبات از بازدارنده های قوی PCR می باشند (Carter et al., 2006). اجتناب از نمونه های آلوده یک نیاز مبرم در چنین مطالعاتی

بعد از خارج شدن از شکم، به طوری که در مطالعه‌ای DNA گیاهان مصرف شده توسط یک گونه تنبل باستانی که منقرض شده (*Nothoprotheriops*) *shasten* بود با استفاده از سرگین‌های باقی‌مانده از آن و قطعات کوتاه DNA به دست آمد (*Oehm et al.*, 2011).

نوع سطح نیز از عوامل تأثیرگذار در حفظ DNA موجود در مدفوع می‌باشد که محققان در طی مطالعه‌ای نشان دادند که، فضولات باقی‌مانده پرندگان بر روی سطوح مختلف، موفقیت شناسایی DNA طعمه را تحت تأثیر قرار می‌دهند که کم‌ترین میزان تأثیرپذیری در فضولاتی بود که بر روی خاک قرار داشتند. DNA سلولی در خاک با ورود به زنجیره غذایی میکروبی به سرعت تجزیه می‌شود و یا ممکن است باقی بماند ولی برای تجزیه و تحلیل - های بیشتر با جذب توسط اسیدهای هومیک، مواد معدنی خاک (خاک رس) و یا دیگر اجزای خاک از دسترس خارج شود. فرضیه آن‌ها این بود که باکتری‌ها و قارچ‌هایی که در همه جای سطح خاک حضور دارند، به سرعت فضولات پرنده را مورد استفاده قرار می‌دهند بنابراین به افزایش سرعت شکسته شدن DNA طعمه کمک می‌نمایند. این فرضیه در تحقیق مذکور با توجه به مشاهدات صورت گرفته که فضولات باقی مانده بر روی خاک طی چند روز کپک زده‌اند ولی این مورد در دیگر سطوح مشاهده نشده است، تایید می‌شود. همچنین نمونه‌های خاک بالاترین بازدارندگی برای PCR را در مقایسه با سطوح دیگر نشان دادند. علاوه بر این، فرضیه‌ای ارائه شده است که در تجزیه مدفوع، مواد بازدارنده طبیعی تولید می‌شوند (*Deagle et al.*, 2005). موفقیت شناسایی DNA طعمه در مدفوع-

میزان غلظت قند می‌باشد. بارنثا و همکاران در سال ۱۹۹۰ اولین بذرهایی از *Salanum spp* را در مدفوع بلبل خرما (*Pycnonotus xanthopygos*) و توکای سیاه (*Turdus merula*) ۵ دقیقه بعد از خوردن را یافتند. بیشترین زمان انتقال قابل ملاحظه بیش از ۱۰/۷ و ۱۲/۷ ساعت به ترتیب برای Folivore hoatzin و Hornbills گزارش شده است. علاوه بر این دیگر فاکتورها مانند سن، جنس و وضعیت سیری پرنده ممکن است حداقل و حداکثر زمان انتقال را تحت تأثیر قرار دهد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که زمان انتقال DNA محتویات شکم احتمالاً تحت تأثیر ترکیب رژیم غذایی، گونه پرنده و وضعیت فیزیولوژی مصرف‌کننده قرار دارد، که نیاز است برای مطالعات میدانی در نظر گرفته شود. به طور کلی، به نظر می‌رسد زمان انتقال در روده پرندگان از چند دقیقه تا چند ساعت باشد، بدان معنی که DNA طعمه در مدفوع‌های تازه در ارتباط نزدیک با قابلیت دسترسی متداول به منبع غذایی خاص است. اخیراً داده‌هایی توسط Deagle و همکاران (۲۰۱۰) ارائه شده است، به این صورت که DNA ماهی‌های مصرف شده ۴ روز قبل توسط پنگوئن از مدفوع پنگوئن و با استفاده از تکنیک پیروسکوئنسینگ با حساسیت بالا تقویت شده است (*Oehm et al.*, 2011).

در مطالعه فوق نور خورشید نیز به عنوان عاملی برای از بین رفتن DNA طعمه‌های موجود در مدفوع می‌شود لذا اگر مواد مدفوعی از نور مستقیم خورشید محافظت و در جای خشک نگهداری شود، می‌تواند به عنوان آرشیو DNA مواد غذایی به طوری که در این مطالعه نشان داده شده، درآیند. این موضوع همواره می‌تواند برای استفاده در زمان‌های

Deagle, B. E., Chiaradia, A., McInnes, J. and Jarman, S. N. 2010. Pyrosequencing faecal DNA to determine diet of little penguins: is what goes in what comes out? *Conservation Genetics*, 11: 2039-2048.

Deagle, B. E., Gales, N. J., Evans, K., Jarman, S. N., Robinson, S., Trebilco, R. and Hindell, M. A. 2007. Studying seabird diet through genetic analysis of faeces: a case study on macaroni penguins (*Eudyptes chrysolophus*). *PLoS ONE*, 2: e831.

Deagle, B. E., Tollit, D. J., Jarman, S. N., Hindell, M. A., Trites, A. W. and Gales, N.J. 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Stellar sea lions. *Molecular Ecology*, 14: 1831-1842.

Parson, K. M., Piertney, S. B., Middlemas, S. J., Hammond, P. S. and Armstrong, J. D. 2005. DNA-based identification of salmonid prey species in seal faeces. 266: 275-281.

Barnett, A., Redd, K. S., Frusher, S. D., Stevens, J. D. and Semmens, J. M. 2010. Non-lethal method to obtain stomach samples from a large marine predator and the use of DNA analysis to improve dietary information. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 393: 188-192.

Dunn, M. R., Szabo, A., McVeagh, M. S. and Smith, P. 2010. The diet of deepwater sharks and the benefits of using DNA identification of prey. *Deep-Sea Research*, 57: 923-930.

Raye, G., Miquel, C., Coissac, E., Redjadj, C., Loison, A. and Taberlet, P. 2011. New insights on diet variability revealed by DNA barcoding and high-throughput pyrosequencing: chamois diet in autumn as a case study. *Ecological Research*, 26: 265-276

Soininen E. M., Valentini, A., Coissac, E., Miquel, C., Gielly, L., Brochmann, C., Brysting, A. K., Sønstebo, J., Ims, R. A., Yoccoz, N. G. and Taberlet, P. 2009.

هایی که بر روی برگ‌ها، شاخه‌ها و مواد پلاستیکی قرار داشتند، مشابه بود. در میان فضولات موجود، DNA طعمه در مدفوع‌های موجود بر روی لوله‌های پلاستیکی به طور معنی‌داری بیشتر از سایر نمونه‌ها شناسایی شد. تیوب‌ها، اگرچه شفاف و بدون پوشش بودند احتمالاً حفاظت از DNA در برابر مقادیر بالای اشعه UV را افزایش داده و احتمال شناسایی طعمه را افزایش می‌دهد (Oehm et al., 2011).

منابع

Valentini, A. 2008. Non-invasive diet analysis based on DNA Barcoding: the Himalayan Brown Bears (*Ursus arctos isabellinus*) as a case study. *PhD Thesis*, University of Degli studi della tuscia di viterbo, 122 p.

Jarman, S. N., Gal, N. J., Tierney, M., Gill, P. C. and Elliott, N. G. 2002. A DNA-based method for identification of krill species and its application to analysing the diet of marine vertebrate predators. *Molecular Ecology*, 11: 2679-2690.

Poinar, H. N., Kuch, M., Sobolik, K. D., Barnes, I., Stankiewicz, A. B., Kuder, T., Spaulding, W. G., Bryant, W. M., Cooper, A. and Paabo, S. 2001. A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America*, 98: 4317-4322.

Hofreiter, M., Poinar, H. N., Spaulding, W. G., Bauer, K., Martin, P. S., Possnert, G. and Paabo, S. 2000. A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation. *Molecular Ecology*, 9: 1975-1984.

Jarman, S. N. and Wilson, S. G. 2004. DNA-based species identification of krill consumed by whale sharks. *Journal of Fish Biology*, 65: 586-591.

of the Food Habits of the Moroccan Dorcas Gazella in M'Sabih Talaa, West Central Morocco, Using the trnL Approach. *PLoS ONE*, 7: e35643.

Zeale, M. K., Butlin, R. K., Barker, G. L. A., Leess, D. C. and Jones, G. 2011. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology Resources*, 11: 236-244.

Taberlet, P. and Fumagalli, L. 1996. Owl pellets as a source for genetic studies of small mammals. *Molecular Ecology*, 5: 301-305.

Farrell, L. E. 1999. The ecology of the puma and the jaguar in the Venezuelan llanos. MS Thesis, University of Florida. Gainesville.

Oehm, J., Juen, A., Nagiller, K., Neuhauser, S. and Traugott, M. 2011. Molecular scatology: how to improve prey DNA detection success in avian faeces?. *Molecular Ecology Resources*, 11: 620-628.

Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixture. *Frontiers in Zoology*, 6:1-9

Pegard, A., Miquel, C., Valentini, A., Coissac, E., Bouvier, F., François, D., Taberlet, P., Engel, E. and Pompanon, F. 2009. Universal DNA-based methods for assessing the diet of grazing livestock and wildlife from feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 5700-5706.

Bamran, M. A. A., Shehzad, W., Ouhammou, A., Abbad, A., Naimi, M., Coissac, E., Taberlet, P. and Znari, M. 2012. Assessment

Foran, D. R., Crooks, K. R. and Minta, S. C. 1997. Species identification from scat: an unambiguous genetic method. *Wildlife Society Bulletin*, 25: 835-839.