

محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران، دوره ۶۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴

صفحات ۲۱-۱۵

تعیین جنسیت گونه گرگ (*Canis lupus*) و سگ (*Canis lupus familiaris*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره کروموزوم Y

مرضیه اسدی آقبلاغی^۱، محمد کابلی^{۱*}، حمیدرضا رضایی^۲، علی شعبانی^۳

۱. گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲. گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۱۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱/۲۳)

چکیده

گوشتخواران بزرگ جثه از جمله گونه‌های جنس *Canis* از عناصر مهم و تکمیل‌کننده زنجیره غذایی اکوسیستم‌ها هستند. با توجه به کاهش شدید این گونه‌ها در بیشتر زیستگاه‌های طبیعی در سطح کشور، اجرای برنامه‌های حفاظتی در این راستا ضروری است. به دلیل جمعیت کم و مشکلات نمونه‌برداری مستقیم، به‌ویژه برای گونه‌های وحشی معمولاً نمونه‌ها به صورت غیرمستقیم به دست می‌آیند (از قبیل مدفوع یا مو) که در اغلب موارد جنسیت این نمونه‌ها نامشخص است. در این مطالعه با به‌کارگیری نشانگرهای ریزماهوره کروموزوم Y، تعیین جنسیت نمونه‌های گرگ و سگ انجام شد و از نشانگر ناحیه (LOOP-D) ژنوم میتوکندری به‌منزله کنترل برای افزایش دقت آزمایش استفاده شد. براساس تشکیل شدن یا نشدن باند در دو جایگاه ریزماهوره ویژه کروموزوم Y جنسیت افراد تعیین شد. تعیین جنسیت نمونه‌های گرگ به‌دست‌آمده یکی از عوامل اساسی در اجرای برنامه‌های حفاظتی محسوب می‌شود و به‌کارگیری کروموزوم‌های جنسی، ابزاری مفید برای تعیین جنسیت در مطالعات مربوط به مدیریت و حفاظت حیات وحش محسوب می‌شود.

کلیدواژه‌گان: تعیین جنسیت، جنس *Canis*، کروموزوم Y، گرگ.

۱. مقدمه

شکار است (Christen *et al.*, 2004). در بسیاری موارد بین افراد نر و ماده تفاوت جنسی ظاهری وجود ندارد که در این صورت با استفاده از روش‌های مستقیم یا روش‌های ژنتیکی به صورت غیرمستقیم که اغلب زیست‌شناسان از نمونه‌های غیرتهاجمی (مانند مدفوع و مو) استفاده می‌کنند، تعیین جنسیت انجام می‌شود. در روش‌های ژنتیکی تعیین جنسیت با بررسی کروموزوم‌های جنسی و معمولاً با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز^۳ انجام می‌شود (Christen *et al.*, 2004). کروموزوم Y کوچک‌ترین کروموزوم در پستانداران است و اندازه آن در سگ‌سانان ۲۷ میلیون جفت باز تخمین زده شده است. کروموزوم Y به نشانگر بارزشی در اکولوژی مولکولی و شناسایی افراد تبدیل شده است. در کل گونه‌های پستانداران ترکیب کروموزومی افراد نر به صورت XY و در افراد ماده به صورت XX است. این کروموزوم زن‌های کمی دارد، همچنین تنوع نوکلئوتیدی کروموزوم‌های جنسی محدودتر از سایر نقاط ژنوم هسته است (Kariya *et al.*, 2009). در این کروموزوم نوترکیبی صورت نمی‌گیرد و فقط در دو قطعه کوچک (شبه‌اتوزومی) در هر دو انتهای این کروموزوم طی فرایند میوز با کروموزوم X نوترکیبی صورت می‌گیرد (Oliver *et al.*, 1999). MS34A-MS34B در گونه‌های جنس *Canis* شناسایی شده‌اند. با توجه به اینکه جایگاه لوکوس‌های MS34B-MS34A در ناحیه غیرترکیبی در کروموزوم Y قرار گرفته است (Sundqvist *et al.*, 2001) و لوکوس‌های مشابه آن‌ها در کروموزوم X وجود ندارد، کروموزوم Y شاخص مناسبی برای تعیین جنسیت در پستانداران است (Hellborg *et al.*, 2004; Frankham, 2005; Godinho *et al.*, 2007, 2011; Nishida *et al.*, 2011). به عنوان مثال تا کنون جایگاه‌های MS34B-MS34A ریزماهوره کروموزوم Y در مطالعات متعددی استفاده شده

اگرچه گرگ‌ها (*Canis lupus*) توانایی زیستن در انواع زیستگاه‌ها را دارند در سال‌های اخیر در بیشتر مناطق کشور جمعیت آن‌ها به شدت کاهش یافته و در برخی مناطق به طور کامل نابود شده است. براساس طبقه‌بندی کنوانسیون تجارت بین‌المللی گونه‌های جانوری و گیاهان وحشی در معرض خطر انقراض CITES^۱ در سال ۲۰۰۷ در طبقه دو (در معرض خطر انقراض) قرار دارد (Ziaei, 2009). گرگ‌ها از جمله طعمه‌خوارانی هستند که تأثیرات زیادی بر پویایی سیستم‌های اکولوژی طعمه-طعمه‌خوار و کنترل جمعیت‌های طعمه می‌گذارند. واحد اجتماعی گرگ‌ها به صورت دسته است، گرگ‌ها معمولاً مونوگام هستند و گرگ نر که گرگ آلفا نامیده می‌شود، هدایت گروه را به عهده دارد و در هر دسته تنها جفت‌های آلفا مجاز به جفت‌گیری اند (Mech & Boitani 2003). تعیین جنسیت یک عامل اساسی در برنامه‌های مدیریت حیات وحش و به‌ویژه در مطالعات رفتاری محسوب می‌شود و در گونه‌های مونوگام اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا نسبت‌های جنسی همواره بر عواملی مانند اندازه جمعیت مؤثر، حداقل جمعیت زیستمند و نرخ رشد گونه‌ها مؤثر هستند و اغلب یک عامل کلیدی در حفاظت جمعیت‌ها محسوب می‌شوند، چنانچه در اجرای برنامه‌های معرفی مجدد و احیای گونه‌ها نسبت جنسی تعداد افراد مؤسس^۲ و تعیین الگوی پراکندگی جنس‌های نر و ماده اهمیت زیادی دارد (Sundqvist *et al.*, 2001). در اغلب پستانداران تفاوت‌های جنسی (مانند تفاوت در اندازه بدن، وجود شاخ و رنگ بدن) وجود دارد و تعیین جنسیت به صورت مستقیم انجام می‌شود ولی روش‌های مستقیم برای برخی گونه‌ها دشوار است، به‌ویژه برای گوشتخواران که اغلب نیاز به مشاهده جانور و یا

1. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
2. Founder effect

3. Polymerase chain reaction

با نتایج حاصل از این پژوهش همخوانی دارد. در نهایت نمونه‌های گرگی که جنسیت نامعلومی داشتند بررسی شدند.

۱.۲. نمونه برداری

با همکاری سازمان حفاظت محیط زیست از ۲۸ قلاده گرگ از نقاط مختلف کشور (همدان، زنجان، قزوین، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، سمنان، اصفهان، چهارمحال و بختیاری، بجنورد، بوشهر، هرمزگان و خوزستان) و ۳۲ قلاده سگ از استان‌های همدان و زنجان نمونه بافت (ماهیچه) تهیه شد. نمونه‌ها ابتدا در الکل و سپس در سیلیکاژل قرار داده شدند و برای استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲.۲. آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های بافتی ابتدا در اتانول ۹۶ درصد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت (AccuPrep) انجام شد. 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 اسپکتروفوتومتری تعیین شد.

۳.۲. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس و الکتروفورس

به منظور تعیین جنسیت نمونه‌های گرگ و سگ از جایگاه‌های ژنی MS34A و MS34B استفاده شد. برای دو لوکوس A و B از دو آغازگر پیشرو و یک آغازگر پسرو استفاده شد و در واکنش PCR از چرخه حرارتی پله‌ای رو به پایین^۳ استفاده شد (جدول ۱) (Sundqvist et al., 2001).

تکثیر جایگاه‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس در حجم ۲۵ میکرولیتر و شرایطی شامل ۲۰ نانوگرم DNA یک واحد بین‌المللی tap DNA پلی‌مراس، بافر PCR ۱x، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم و آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۵ میکرولیتر

است، با استفاده از این دو جایگاه ریزماهواره کروموزوم Y در اروپا تعیین جنسیت نمونه‌های بافت و نمونه‌های غیرتهاجمی جنس *Canis* صورت گرفت (Lacolina et al., 2010; Sundqvist et al., 2001). تعیین جنسیت و پلی‌مورفیسم گونه‌های نهنگ و شیر دریایی نیز با استفاده از نشانگرهای کروموزوم Y بررسی شد (Nishida et al., 2009; Kariya et al., 2007).

بنابراین، در این پژوهش سگ اهلی به منزله یکی از گونه‌های جنس *Canis* به دلیل سهولت دسترسی به نمونه‌ها نیز بررسی و تلاش شد که جنسیت نمونه‌های ژنتیکی دو گونه گرگ و سگ با بررسی دو جایگاه MS34B-MS34A ریزماهواره کروموزوم Y تعیین شود.

۲. مواد و روش‌ها

طی این مطالعه دو لوکوس ریزماهواره ویژه کروموزوم Y با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس در ۲۸ نمونه گرگ از استان‌های مختلف کشور و ۳۲ نمونه سگ بررسی شدند و برای یقین در تعیین جنسیت از نشانگر ناحیه کنترل^۱ ژنوم میتوکندری (loop-d)^۲ به منزله کنترل برای افزایش دقت آزمایش استفاده شد (در کل نمونه‌های بررسی شده تکثیر ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری برای تعیین کیفیت DNA استخراجی در نمونه‌ها به کار برده شد). شایان ذکر است که نمونه‌های سگ و بعضی نمونه‌های گرگ که به صورت مستقیم تهیه شدند، جنسیت آن‌ها هنگام نمونه‌برداری ثبت شد، ولی نمونه‌های گرگ متعلق به بانک ژن سازمان حفاظت محیط زیست جنسیت نامشخص داشتند. ابتدا نمونه‌های سگ که جنسیت مشخص داشتند آزمایش شدند و بعد از کسب اطمینان از صحت تعیین جنسیت، نمونه‌های گرگی که جنسیت آن‌ها هنگام نمونه‌برداری ثبت شده بود بررسی شدند و نتایج نشان داد که جنسیت نمونه‌ها

3. Touchdown

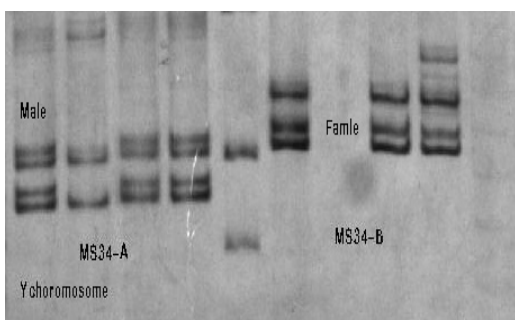
1. Control region (d-loop)
2. Displacement loop

سپس محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به روی ژل آگاروز دودرصد و ژل اکریل آمید هشت‌درصد جداسازی شدند. در نهایت تصاویر مربوط به ژل‌ها با استفاده از دستگاه مستندساز ژل ثبت شد و باندهای تکثیرشده با استفاده از نرم‌افزار Gelpro Analyzer مشاهده شدند.

انجام گرفت. چرخه دمایی برای تکثیر هر دو جایگاه با استفاده از برنامه دمایی پله‌ای رو به پایین انجام شد که عبارت بود از: ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۴۸ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ ثانیه از ۵۹-۶۹ درجه، یک دقیقه در ۷۲ درجه و بسط نهایی با ۷۲ درجه در ۱۰ دقیقه.

جدول ۱. خصوصیات جایگاه‌های ژنی به کار برده شده در این مطالعه

دمای اتصال	آغازگر	وزن (جفت باز)	جایگاه ژنی
۵۹-۶۹	F:AGCCATTCCTGGCCGAGTG R:GGTCCCCTTTGCCATAGTGT	۱۷۰-۱۸۲	MS34A
۵۱-۵۸	F:AGCCATTCCTGGCCGAGTCC R:GGTCCCCTTTGCCATAGTGT	۱۸۰-۱۹۲	MS34B



شکل ۲. تکثیر دو جایگاه (MS34B-MS34A) ریزماهوره کروموزوم Y نمونه‌های مطالعه شده

۴. بحث و نتیجه گیری

با توجه به اینکه جایگاه لوکوس‌های MS34A و MS34B روی بازوی کوچک (p-arm) بین سانترومر و ژن SRY، در ناحیه غیر ترکیبی کروموزوم Y قرار دارند، این دو جایگاه فقط در نمونه‌های جنس نر تکثیر شدند. ولی ژنوم ناحیه کنترل میتوکندری که در کل نمونه‌ها به‌منزله کنترل برای تعیین کیفیت DNA استخراجی در نمونه‌ها به کار برده شد، در هر دو جنس نر و ماده تکثیر شد. با در نظر گرفتن اینکه این دو ریزماهوره نتایج یکسانی در تعیین جنسیت داشتند، می‌توان نتیجه گرفت حتی با کاربرد یکی از این دو ریزماهوره براساس تشکیل شدن یا نشدن باند، می‌توان جنسیت گونه‌های جنس *Canis* را به‌خوبی تعیین کرد. کروموزوم Y پویایی زیادی دارد و به این دلیل بعضی ژن‌های این کروموزوم را

۳. نتایج

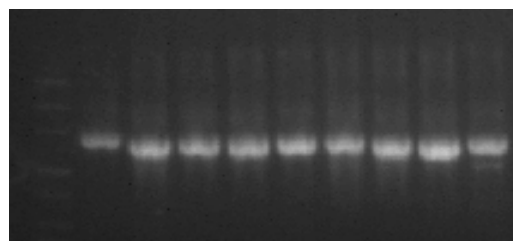
۳.۱. تکثیر ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری

در تمامی نمونه‌های بررسی شده با استفاده از دو آغازگر پیشرو pro-L و پسرو phe-H ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری که (به‌منزله کنترل برای تعیین جنسیت) تکثیر شد (شکل ۱). اندازه قطعه تکثیرشده حدود ۱۴۰۰-۱۵۰۰ جفت باز بود.

۳.۲. تکثیر دو جایگاه MS34B-MS34A

ریزماهوره کروموزوم Y

این دو جایگاه در گرگ‌ها و سگ‌های ماده که جنسیت مشخصی داشتند تکثیر نشدند ولی در نمونه‌هایی با جنسیت نر به‌خوبی تکثیر شدند (شکل ۲). همچنین این دو جایگاه در سه فرد از گرگ‌ها با جنسیت نامشخص تکثیر نشدند که این نمونه‌ها به‌منزله نمونه‌های ماده شناسایی شدند (جدول ۲).



شکل ۱. تکثیر نشانگر ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری در نمونه‌های مطالعه شده (نمونه‌های نر و ماده)

شغال، کایوت و دینگو) تکثیر می‌شوند، همچنین Rutledge و Koblmuller توانستند جنسیت گونه‌های کایوت، گرگ سرخ و گرگ خاکستری را در آمریکای شمالی با استفاده از بررسی جایگاه‌های ریزماهوره ویژه کروموزوم Y در نمونه‌های بافتی و نمونه‌های غیرتهاجمی تعیین کنند (Olivier et al., 1999; Rutledge et al., 2009, Koblmuller et al., 2010). همچنین Sugimoto برای تعیین ساختار ژنتیکی دو گونه در خطر انقراض ببر آمور و پلنگ با طراحی آغازگرهای ویژه کروموزوم Y در گربه‌سانان توانستند جنسیت این دو گونه را براساس تشکیل شدن یا نشدن باندها با استفاده از تکنیک RFLP در ۱۰۲ نمونه سرگین و بافت تعیین کنند (Sugimoto et al., 2006).

نمی‌توان در همه گونه‌ها تکثیر کرد، بنابراین، در طراحی نشانگرها برای بخش‌های حفاظت شده این کروموزوم باید دقت صورت گیرد (Hellborg et al., 2004). با توجه به اینکه جایگاه‌های ریزماهوره به کار گرفته شده در این مطالعه براساس گرگ‌های اروپا طراحی شده بودند ولی به‌خوبی در گرگ‌های ایران که از سطح تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به گرگ‌های اروپا برخوردارند، تکثیر شدند (Asadi, 2012). طی انجام این پژوهش در تکثیر شدن یا نشدن جایگاه‌های ریزماهوره کروموزوم Y بین دو گونه گرگ و سگ تفاوتی مشاهده نشد. براساس نتایج Olivier در سال ۱۹۹۹ که این جایگاه‌ها را در گونه‌های مختلف بررسی کرد، نشان داد که این دو جایگاه در گونه‌های جنس *Canis* (گرگ، روباه،

جدول ۲. نتایج تعیین جنسیت نمونه‌های گرگ و سگ

گونه	تعداد افراد	تکثیر ناحیه کنترل ژنوم میتوکندری	تکثیر جایگاه	تکثیر جایگاه
			MS34A	MS34B
نمونه‌هایی که جنسیت مشخص داشتند	گرگ ۱۳	۴ نمونه ماده	-	-
		۹ نمونه نر	✓	✓
نمونه‌هایی که جنسیت نامشخص داشتند	سگ ۳۲	۱۵ نمونه ماده	-	-
		۱۷ نمونه نر	✓	✓
نمونه‌هایی که جنسیت نامشخص داشتند	گرگ ۱۵	۳ نمونه ماده	-	-
		۱۲ نمونه نر	✓	✓

جنسیت به‌صورت مستقیم وجود ندارد، بنابراین سعی بر این است که از نمونه‌های غیرتهاجمی مانند مو و سرگین استفاده شود، که معمولاً جنسیت چنین نمونه‌هایی نامشخص است و با استفاده از نشانگرهای ویژه کروموزوم‌های جنسی مانند کروموزوم Y می‌توان جنسیت نمونه‌ها را مشخص کرد (Frankham, 2005; Seddon et al., 2005; Scandura, 2004; Scandura, 2005). امروزه استفاده از کروموزوم‌های جنسی به‌ویژه کروموزوم Y روش مناسبی برای تعیین جنسیت نمونه‌هایی که به دلایل متفاوتی مانند کشف نمونه از

با توجه به تخریب شدید زیستگاه‌های طبیعی و کاهش جمعیت گونه‌های جنس *Canis* (از جمله گونه‌های در معرض تهدیدی مانند شاه‌روباه و روباه ترکمنی) در بیشتر نقاط کشور و تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در برنامه‌های حفاظتی و مدیریت جمعیت‌ها تعیین جنسیت امری لازم به شمار می‌رود. معمولاً در اجرای برنامه‌های حفاظت حیات وحش به‌دلیل تراکم پایین گوشتخواران و ویژگی‌های خاص رفتاری آن‌ها مانند کمیاب‌بودن، فعالیت، داشتن خوی تهاجمی و نظایر آن، در بیشتر مواقع امکان نمونه‌برداری مستقیم و تعیین

استان همدان که در مراحل نمونه‌برداری این پژوهش همکاری کردند، تقدیر و تشکر می‌شود. این پژوهش با حمایت مالی اداره کل حفاظت محیط زیست استان همدان در چارچوب طرح کاربردی آن اداره کل به انجام رسیده است.

شکارچیان متخلف و اطلاعاتی در خصوص جنسیت آن‌ها در دسترس نیست، محسوب می‌شود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از همکاری کلیه محیط‌بانان و کارشناسان محترم اداره کل حفاظت محیط زیست

REFERENCES

- Asadi, A.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. 100 p (.in Persian).
- Christen, L.W., Stewart, W.B., Bruce, W.B. Genetic methods improve accuracy of gender determination in beavers. *Journal of Mammalogy*. 2004. 85.6: 1145-1148.
- Frankham R. :Genetics and extinction . *Biological Conservation* .2005. 126 .131-140.
- Godinho, R., Llaneza, L., Blanco, J.C., Lopes, S., Álvares, F., García, E.J., Palacios, V., Cortes, Y., Talegon, J., Ferrand, N . Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula .*Molecular Ecology* .2011 .20, 5154-5166.
- Hellborg, L., Ellegren, H .Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes .*Molecular Biology and Evolution*. 2004: 2.11 .158-163.
- Koblmueller, S., Nord, M., Wayne, R., Leonard, J .Origin and status of the Great Lakes wolf. *Molecular Ecology* .2009. 18 . 2313-2326.
- Kariya, T., Igarashi, M., Wada, K., Burkanov, V., Koyama, S., Hoshino, H., Oshida, T .Lack of sequence variation of Y chromosome-linked loci in Steller's sea lions) *Eumetopias jubatus* (from Iony Island and the Kuril Islands. *Mammalogical Society of Japan* .2009. 34 :33-36 .
- Lacolina, L., Scandura, M., Gazzola, A., Cappai, N., Claudia, C., Mattioli, L., Vercillo, F., Apollonio, M. Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves : A contribution to the study of wolf-dog. *Mammalian Biology* .2010. 75 .341-347.
- Mech, L.D., Boitani, L .Wolf social ecology . In :wolves behavior, ecology and conservation .University of Chicago press, Chicago .Illinois .2003 .pp. 472.
- Nishida, S., Goto, M., Pastene, L., Kanda, N., Koike, H .Phylogenetic Relationships Among Cetaceans Revealed by Y-Chromosome Sequences .*Zoological Science* .2007 .24 .723-732.
- Olivier, M., Lust, G .Two DNA sequences specific for the canine Y chromosome. *Animal Genetics* .1998 .29 :146-14.
- Olivier, M., Breen, M., Binns M., Lust, G . Localization and characterization of nucleotide sequences from the canine Y chromosome .*Chromosome Research* .1999 . 7 .223-233.
- Rutledge, L., Garroway, C., Loveless, K., Patterson, B. Genetic differentiation of eastern wolves in Algonquin Park despite bridging gene flow between coyotes and grey wolves .*Heredity* .2010 .1-12.
- Scandura, M .The use of microsatellites in the study of social structure in large mammals :Italian wolf and fallow deer as case studies .University of Bielefeld, Faculty of. 2004. pp:135.
- Scandura, M .Individual sexing and genotyping from blood spots on the snow :A reliable source of DNA for non-invasive genetic surveys .*Conservation Genetics* . 2005 .6:871-874.
- Seddon, J.M. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples .*Conservation Genetics* . 2005 .6 :147-149 .

17. Sugimoto, T., Nagata, J., Aramilev, V., Belozor, A., Higashi, S., McCullough, D. Species and sex identification from faecal samples of sympatric carnivores, Amur leopard and Siberian tiger, in the Russian Far East. 2006. 7:799–802.
18. Sundqvist, A.K., Ellegren, H., Olivier, M., Vila, C. Y chromosome haplotyping in scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. Molecular Ecology. 2001. 10. 1959–1966.
19. Sundqvist, A.K., Björnerfeldt, S., Leonard, J., Hailer, F., Hedhammar, A., Ellegren, H., Vila, C. Unequal Contribution of Sexes in the Origin of Dog Breeds. Genetics. 2006. 172. 1121–1128.
20. Ziaei, H. A Field Guide to the Mammals of Iran. Tehran: Iran Wildlife Center. 2009. 420 p. (in Persian).