

---

# JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE, BIOLOGY AND BIOECONOMY

wcześniej – formerly

Annales UMCS sectio EE Zootechnica

VOL. XXXVII(1)

2019

CC BY–NC–ND

DOI: 10.24326/jasbb.2019.1.4

<sup>1</sup> Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej,  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

<sup>2</sup> Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Zwierząt,  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin  
e-mail: magdalena.gryzinska@up.lublin.pl

SYLWIA NAKONIECZNA<sup>1</sup>, MAŁGORZATA GRELA<sup>2</sup>, PIOTR LISTOS<sup>2</sup>,  
MAGDALENA GRZYŃSKA<sup>1</sup>

## **Molekularne metody identyfikacji gatunkowej wykorzystywane w ekspertyzach sądowych**

Molecular methods of species identification used in forensic examinations

**Streszczenie.** Identyfikacja gatunkowa zwierząt przeprowadzana metodami biologii molekularnej odgrywa coraz większą rolę w praktyce laboratoriów kryminalistycznych na całym świecie. W Polsce coraz częściej metody te wykorzystywane są w celu określenia, czy gatunek podlega ochronie w rozumieniu przepisów Ustawy o ochronie przyrody. Wynika to z licznych przypadków nielegalnego handlu ginącymi gatunkami zwierząt, co dotyczy zarówno obrotu żywymi zwierzętami, jak i produktów, przedmiotów wykonanych z różnych części ciała zwierząt. W takich też przypadkach, gdzie identyfikacja na podstawie cech morfologicznych gatunku nie jest możliwa, analiza DNA zwierzęcego ma szczególne znaczenie. W pracy przedstawiono typowe markery molekularne stosowane w identyfikacji gatunkowej zwierząt.

**Słowa kluczowe:** identyfikacja gatunkowa, mitochondrialny DNA, barkoding DNA

### WSTĘP

Spośród ok. 12 mln gatunków występujących na świecie w pełni zidentyfikowano zaledwie ok. 1,7 mln. Identyfikację gatunków przeprowadza się na podstawie cech morfologicznych, co wymaga specjalistycznej wiedzy [Skuza i in. 2015]. Zarówno do identyfikacji nowych, jak i rozróżnienia znanych gatunków wykorzystuje się techniki biologii molekularnej. Dzięki nim na podstawie niewielkiej ilości DNA można określić gatunek zwierzęcia, od którego została pobrana próbka.

Identyfikacja gatunkowa opiera się przede wszystkim na wykorzystaniu takich testów, jak amplifikacja oraz sekwencjonowanie fragmentu genów cytochromu b i oksydazy cytochromowej (*COI*). Analiza cytochromu b sprawdza się w identyfikacji gatunkowej kręgowców, natomiast analiza genu oksydazy cytochromowej *COI* jest pomocna w identyfikowaniu kręgowców, w tym również ryb. Do identyfikacji blisko spokrewnionych gatunków, np. kota i żbika czy psa i wilka, można zastosować analizę sekwencji pętli D mitochondrialnego DNA.

#### PRZEMYT ORAZ NIELEGALNY HANDEL GATUNKÓW ZAGROŻONYCH WYGINIĘCIEM

Nielegalny handel żywymi oraz martwymi okazami zwierząt stanowi bardzo duży problem. Według raportu Światowego Funduszu na rzecz Przyrody (World Wildlife Found, WWF) wartość nielegalnego handlu dzikimi zwierzętami szacowana jest rocznie na 19 miliardów dolarów amerykańskich. Stanowi trzeci co do zyskowności czarny rynek na świecie, po handlu bronią i narkotykami [McGarth 2012]. Na świecie ponad 30 tysięcy gatunków roślin i zwierząt zagrożonych jest wyginieciem, zaś głównym problemem jest kłusownictwo. Niestety mimo ciągłych kampanii uświadamiających wciąż bardzo popularne i chętnie kupowane przez turystów są wyroby wykonane ze zwierząt i roślin zagrożonych wyginieciem. W ciągu roku w bagażach podróżnych służby celne znajdują kilkanaście tysięcy okazów.

Ochrona gatunkowa zwierząt w Polsce realizowana jest m.in. na podstawie Ustawy z 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody [Dz.U. z 2015 r. poz. 1651, tekst jedn.]. Według art. 46, ust. 2 ww. Ustawy celem ochrony gatunkowej jest „zapewnienie przetrwania i właściwego stanu ochrony dziko występujących na terenie kraju lub innych państw członkowskich Unii Europejskiej rzadkich, endemicznych, podatnych na zagrożenia i zagrożonych wyginieciem oraz objętych ochroną na podstawie przepisów umów międzynarodowych, których Rzeczpospolita Polska jest stroną, gatunków roślin, zwierząt i grzybów oraz ich siedlisk i ostoi, a także zachowanie różnorodności gatunkowej i genetycznej”. Mimo iż Ustawa zakazuje m.in. przywożenia z zagranicy oraz wywożenia poza granicę państwa okazów gatunków objętych ścisłą ochroną, turyści, chociaż nie zdają sobie z tego sprawy, wciąż kupują przedmioty wykonane z tkanek zwierząt należących do gatunków zagrożonych wyginieciem [Listos i in. 2016]. Takie działanie, choć często nieświadome, stwarza zagrożenie dla przyrody i środowiska naturalnego.

Problemem orzecznictwa sądowego jest brak powszechnego wykonywania badań zwierzęcego DNA w sprawach dotyczących handlu dzikimi zwierzętami należącymi do gatunków zagrożonych wyginieciem, w których przedmiotem przestępstwa są wysoko przetworzone części zwierząt, a tym samym niemożliwe do rozpoznania na podstawie cech morfologicznych gatunku. Często z takich materiałów wykonywane są kosmetyki. Po poddaniu obróbce tego typu materiałów podczas przygotowywania docelowego produktu nie można stwierdzić makroskopowo, czy produkt ten zawiera nielegalne składniki. Problem ten występuje także w produktach tradycyjnej medycyny azjatyckiej – poszczególne gatunki zwierząt mogą występować na przykład w postaci różnego rodzaju mieszanek. W praktyce spotykane są wyroby z tkanek zwierzęcych, takich jak: pazury,

rogi, sierść, włosy, ciosy, karapaksy, plastry, muszle, skóry, kości oraz zęby. Najczęściej sprzedawane są w postaci biżuterii, kosmetyków, torebek, przedmiotów codziennego użytku [Dębska 2013].

Polski raport z 2010 r. przedstawia badania rynku, z których wynika, że produkty zawierające składniki otrzymane z chronionych gatunków zwierząt występowały w postaci takich produktów jak: maści, plastry, tłuszcz, nalewki, tabletki, maseczki, kremy. W sklepach zielarskich i farmakologicznych dostępne były środki odchudzające, kosmetyki, suplementy diety, maści zawierające w swym składzie substancje pochodzące od zwierząt chronionych prawem [Romanowicz i Podgórska 2010]. Istnieje duży problem przy rozpoznaniu nielegalności tych produktów. Przedstawione w pracy metody identyfikacji zwierząt na podstawie analizy DNA mogą być wykorzystywane w badaniach tego typu wyrobów.

#### GENOM ZWIERZĘCY

Na genom ssaków składa się genom mitochondrialny oraz jądrowy. Genom jądrowy zbudowany jest z wielu linowych cząsteczek DNA, które, łącząc się z histonami, tworzą odrębne chromosomy, czyli samoodtwarzające się stałe składniki jądra komórkowego. Typowy eukariotyczny chromosom zawiera odcinek DNA o długości 1–20 cm, który mieści się w chromosomie dzięki swoistemu mechanizmowi upakowania [Korytko i Łaczmańska 2016]. Bardzo ważnym elementem mechanizmu pakowania DNA są histony, będące specyficznymi białkami, stanowiącymi 40–50% składu chromatyny. Wykazują one silnie zasadowy charakter dzięki wysokiej zawartości argininy i lizyny. Histony to białka gatunkowo i tkankowo niespecyficzne, charakteryzujące się wysokim konserwatyzmem, tzn. mające podobną budowę niezależnie od tkanki, gatunku czy osobnika. Wyróżnia się pięć klas histonów: H1 (łącznik nukleosomowy), H2A i H2B (histony brzegowe) oraz H3 i H4 (histony rdzeniowe). Histony tworzą nukleosom, stanowiący podstawową strukturalną jednostkę chromatyny. DNA jądrowy jest większy od genomu mitochondrialnego. Jego długość u ssaków waha się od ok. 2,4 do 3,0 mld par zasad [Koseniuk i in. 2015].

Mitochondrialny DNA jest dwuniciową, kolistą cząsteczką, liczącą ok. 16,5 tys. par zasad (bydło 16 338, owca 16 580, kura 16 775). Zbudowany jest z regionu kodującego, zawierającego ogółem 37 genów (niezawierających intronów), w tym 13 genów kodujących białkowe produkty uczestniczące w fosforylacji oksydacyjnej, 2 geny rybosomowego RNA (rRNA) i 22 geny tRNA [Brown 1980]. Występowanie jednakowych genów w genomie mitochondrialnym różnych organizmów nie pozawala jednak na używanie jednakowych sond w celu identyfikacji materiału genetycznego różnych gatunków, co uwarunkowane jest zmiennością w sekwencji genów. Mimo że geny te odpowiadają za produkcję tych samych białek, ich sekwencja jest zmienna u różnych organizmów. Przykładem genu, gdzie sekwencja jest zróżnicowana w małym stopniu, jest gen kodujący pierwszą podjednostkę oksydazy cytochromowej (*COI*), dlatego wykorzystuje się go do identyfikacji gatunkowej.

Dziedziczenie w obrębie mitochondrialnego DNA różni się od dziedziczenia w obrębie genomowego DNA, w którym poza autosomami znajdują się również allosomy –

identyczne u samic (XX) i różne u samców ssaków (XY). U ssaków i ptaków mitochondrialne DNA (mtDNA) zawarte w mitochondriach przekazywane jest niemal wyłącznie w linii matczynej (żeńskej). Wynika to z faktu, że wszystkie lub niemal wszystkie mitochondria pochodzą z oocyty. Tym samym w mitochondrialnym DNA zostają ujawnione haplotypy w obrębie badanej sekwencji mtDNA pochodzące wyłącznie od matki. Liczba kopii mtDNA waha się od 1000 do 10 000 w jednej komórce. W budowie mitochondrialnego DNA nie uczestniczą białka [Giles i in. 1980].

Genom mitochondrialny jest szeroko stosowany w badaniach filogenetycznych zwierząt, ponieważ ewoluuje znacznie szybciej niż jądrowy DNA, gromadząc różnice między ściśle powiązаныmi gatunkami [Herbert i in. 2004]. W genomie tym wyróżnia się pewne pozycje nukleotydowe zwane „gorącymi miejscami” (ang. *hot spots*), w których częstość mutacji znacznie przewyższa średnią częstość mutacji charakterystyczną w innych miejscach w mtDNA. Pozycje te występują zarówno w regionie HVR I, jak i HVR II. Wśród „miejsc gorących” w HVR I można wyróżnić m.in. pozycje: 16093, 16129, 16189, 16311, 16362 i 16519, a w HVR II: 152, 146, 150 i 195 [Malyarchuk i in. 2002, Salas i in. 2007]. Systemy naprawcze mitochondrialnego DNA cechują się mniejszą wydajnością w porównaniu z systemami DNA obecnymi w jądrze komórkowym. Nieosłonięty histonami mtDNA narażony jest na działanie wolnych rodników, co sprawia, że częściej zachodzą w nim mutacje niż w DNA jądrowym. Nie występują zatem rekombinacje genomów lub zachodzą w minimalnym stopniu, czego skutkiem może być heteroplazmia [Sloan i in. 2012], czyli obecność więcej niż jednego rodzaju DNA pozajądrowego (mitochondrialnego lub chloroplastowego). Zjawisko to występuje w przypadku wspólnego wkładu obojga rodziców w pulę pozajądrowego DNA potomstwa (przeciek ojcowski lub dziedziczenie biparentalne) lub w efekcie mutacji [Tully i in. 2000]. Zjawisko heteroplazmii nie dyskwalifikuje wykorzystania analizy mtDNA jako dowodu w sądzie, przeciwnie może nawet zwiększyć siłę dowodu.

Po raz pierwszy całkowita sekwencja genomu mitochondrialnego została opublikowana w 1981 r. Genom mitochondrialny pochodził z europejskiej próby łożyska ludzkiego. Jego sekwencja została odczytana za pomocą bydlęcego genomu mtDNA oraz linii afrykańskich komórek HeLa [Anderson i in. 1981]. Została ona określona jako sekwencja referencyjna z Cambridge – CRS (ang. *Cambridge reference sequence*). Zawierała jednak błędy, które zostały skorygowane prawie dwadzieścia lat później przez Andrewsa i in. [1999]. Poprawioną sekwencję określa się jako rCRS (ang. *revised Cambridge reference sequence*) i zalicza do europejskiej haplogrupy H (numer akcesyjny w GenBanku: NC\_012920.1).

Wśród zwierząt gospodarskich sekwencje mtDNA zidentyfikowano po raz pierwszy u bydła [Anderson i in. 1982], następnie u koni [Xu i Aranson 1994], owiec i świń [Hiendleder i in. 1998, Ursing i Arnason 1998], a najpóźniej u kóz [Luikart i in. 2001]. Sekwencje pierwszych mitogenomów uzyskano dla dwóch gatunków wymarłych ptaków moa (*Anomalopteryx nidiformis* i *Emu cerassus*) [Cooper i in. 2001, Haddrath i Baker 2001], co pozwoliło na wyjaśnienie relacji filogenetycznych tych wymarłych gatunków ze współcześnie żyjącymi największymi niecietami z rodzaju *Struthioniformes* [Hofreiter i in. 2014].

## METODY IDENTYFIKACJI GATUNKU

**Barkoding DNA**

W roku 2003 na Uniwersytecie Guelph w Kanadzie opracowano nową metodę identyfikacji gatunków – barkoding DNA. Nazwa pochodzi od angielskich słów *bar codes* i nawiązuje do kodów kreskowych nadawanych towarom. Jest to technika wykorzystująca sekwencjonowanie jednego lub kilku *loci*, dzięki czemu uzyskuje się „kod paskowy DNA”, informujący o kolejności zasad w odcinku DNA. Porównując ze sobą uzyskane krótkie sekwencje, można ustalić przynależność gatunkową osobników [Herbert i in. 2004, Ajmal i in. 2014].

Jako kod paskowy DNA wykorzystuje się krótką, zdefiniowaną sekwencję genomu. Celem poszukiwań badaczy jest odcinek DNA, dzięki któremu rozróżnianie gatunków w różnych stadiach rozwojowych będzie ułatwione. W królestwie zwierząt najlepszym z nich jest gen kodujący oksydazę cytochromu c (*COI*) o długości 648 par zasad, zlokalizowany w genomie mitochondrialnym. Stanowi on idealny znacznik identyfikacyjny zwierząt ze względu na brak intronów, mniejsze prawdopodobieństwo rekombinacji, występowanie konserwatywnych miejsc starterowych oraz prostą, zdefiniowaną sekwencję. Dodatkowo występuje w wielu kopiach, w przeciwieństwie do genów pochodzących z genomu jądrowego [Skuza i in. 2015].

Do powielania regionu genu kodującego oksydazę cytochromu c (*COI*) używane są uniwersalne pary starterów. Poprzez amplifikację tego samego genu z różnych organizmów możliwe jest zbudowanie biblioteki sekwencji genów. Istotną rzeczą jest znajomość grupy taksonomicznej (ryby, ptaki, ssaki itd.) badanego organizmu, ponieważ startery używane w reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) są specyficzne dla grup taksonomicznych [Kelle i in. 2014]. Po amplifikacji produkt PCR (ok. 700 par zasad) jest sekwencjonowany. Istnieją dwie podstawowe bazy, służące do analizy sekwencji DNA: Barcode of Live Data Systems (BOLD) oraz National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Pierwszy z tych serwisów (BOLD) jest narzędziem umożliwiającym porównanie sekwencji DNA z próbkami, które już zostały zidentyfikowane, oraz zawierającym dodatkowe dane o próbkach. Baza ta jest ośrodkiem informacji o kodach paskowych DNA [Kelle i in. 2014]. Dzięki niej można znaleźć informacje taksonomiczne, tj. dendrogram poszczególnych taksonów, a także określić dystans genetyczny pomiędzy jednostkami systematycznymi. Baza BOLD jest biblioteką zawierającą w szczególności sekwencje DNA zwierząt, uzyskane w oparciu o gen kodujący oksydazę cytochromu c (*COI*) [Heise i in. 2015]. Program BLAST porównuje natomiast badany fragment DNA z innymi obecnymi w bazach danych i serwerach NCBI oraz ustala stopień podobieństwa między nimi. Dzięki temu można przydzielić analizowaną sekwencję do gatunku z bazy.

## CYTOCHROM B (MTCYB)

Określenie przynależności gatunkowej jest możliwe dzięki konserwatywnej sekwencji nukleotydów genu kodującego cytochrom b w obrębie mitochondrialnego DNA.

Cytochrom b jest jedyną podjednostką kompleksu III, która kodowana jest przez mtDNA. Gen cytochromu b (*MTCYB*) koduje białko złożone z 380 aminokwasów, wchodzące w skład III kompleksu oksydacyjno-forylacyjnego. *MTCYB* kodowany jest przez łańcuch ciężki mtDNA bogaty w guaninę, który charakteryzuje się również dużą konserwatywnością, czyli brakiem zmienności osobniczej [Prusak i in. 2005]. Para starterów komplementarnych do regionów otaczających tę sekwencję pozwala na przeprowadzenie specyficznej amplifikacji mtDNA w obrębie różnych gatunków zwierząt. W przypadku sekwencjonowania genu cytochromu b u różnych gatunków kręgowców, należących do gromady ryb, płazów, gadów, ptaków i ssaków, stwierdzono, że do identyfikacji wystarczy użycie jednej pary uniwersalnych primerów. Siła dyskryminacji przy rozpoznawaniu próbek pochodzących od osobników nawet z pokrewnych grup taksonomicznych jest olbrzymia, a prawdopodobieństwo spotkania dwóch gatunków o identycznej sekwencji jest praktycznie niemożliwe. Dlatego też stanowi główny marker wykorzystywany w badaniach taksonomicznych i filogenetycznych. Uzyskaną sekwencję poddaje się analizie bioinformatycznej za pomocą programu BLAST. Identyfikacja gatunku możliwa jest także, gdy brakuje materiału porównawczego. Niestety w przypadku bardzo blisko spokrewnionych gatunków (np. psa i wilka czy kota i kota dzikiego) taka metoda identyfikacji gatunkowej nie sprawdza się.

Analiza sekwencji nukleotydowej genu cytochromu b pozwala na rozróżnienie, czy ślad zabezpieczony na miejscu zdarzenia pochodzi od człowieka czy też od zwierzęcia. Badania identyfikacyjne z wykorzystaniem rejonu cytochromu b wskazują na możliwość zastosowania tej metody do identyfikacji zagrożonych wyginięciem gatunków zwierząt, w tym tkanek pozyskiwanych od tygrysów [Wan i Fang 2003, Wetton i in. 2004], jaj i pancerzy żółwi [Moore i in. 2003, Hsieh i in. 2006, Rohilla i Tiwari 2008], skór krokodyli [Meganathan i in. 2009], rogów nosorożców [Hsieh i in. 2003], kości słońcowej [Lee i in. 2009, Wozney i Wilson 2012], woreczków żółciowych niedźwiedzi [Pepin i in. 2008] oraz tkanek różnych gatunków ptaków [Lee i in. 2008].

#### PĘTLA D MITOCHONDRIALNEGO DNA

Oprócz regionu kodującego w mtDNA występuje region kontrolny (zwany również pętlą D) o długości 1122 par zasad, który jest odpowiedzialny za regulację transkrypcji oraz inicjację replikacji [Foran i in. 1988]. W pętli D można wyróżnić dwa hiperzmiennne regiony, tj. HVRI (*hypervariable region I*) i HVRII (*hypervariable region II*), które różnią się między sobą u poszczególnych osobników.

Analiza sekwencji regionu kontrolnego mtDNA stosowana jest w celu identyfikacji blisko spokrewnionych gatunków. Sekwencja ta charakteryzuje się bardzo wysoką polimorficznością. Ze względu na bardzo dużą szybkość ewolucji pętli D badania z jej wykorzystaniem są przeprowadzane rzadko, tylko do różnicowania osobników należących do dwóch gatunków o dużym stopniu pokrewieństwa, np. kota i żbika czy psa i wilka. Właściwość ta wykorzystywana jest w genetyce populacyjnej, filogenezie i medycynie sądowej [Skonieczna i in. 2012].

## PODSUMOWANIE

Zastosowanie metod molekularnych odgrywa zasadniczą rolę, gdy ocena przynależności gatunkowej nie jest możliwa na podstawie cech morfologicznych. Wskazane metody genetycznej identyfikacji gatunku mogą być wykorzystywane podczas badań sądowych w celu określenia, czy gatunek nie podlega ochronie w rozumieniu przepisów Ustawy z dn. 16.04.2004 r. o ochronie przyrody. Przedstawione w artykule metody umożliwiają szybkie wykrycie przynależności gatunkowej produktów pochodzenia zwierzęcego pochodzących z nielegalnych źródeł, co stanowi podstawę przeprowadzenia kontroli jakości w ramach nadzoru handlowego. Systemy identyfikacji wciąż są doskonałe, tak aby możliwe było szybkie określenie gatunku z prób o różnym pochodzeniu i różnym stopniu przetworzenia.

## PIŚMIENNICTWO

- Ajmal Ali M., Gyulai G., Hidwegi N., Kerti B., Hemaïd F. al, Pandey A. K., Lee J., 2014. The changing epitome of species identification – DNA barcoding. *Saudi J. Biol. Sci.* 21, 204–231. DOI: 10.1016/j.sjbs.2014.03.003
- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., Bruijn M.H. de, Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465. DOI: 10.1038/290457a0
- Anderson S., Bruijn M.H. de, Coulson A.R., Eperon I.C., Sanger F., Young I.G., 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA, conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156, 683–684.
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell N., 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 23(2), 147. DOI: 10.1038/13779
- Brown W.M., 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 77, 3605–3609. DOI: 10.1073/pnas.77.6.3605
- Cooper A., Lalueza-Fox C., Anderson A., Rambaut A., Austin J., Ward R., 2001. Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* 409(1), 704–706. DOI 10.1038/35055536
- Dębska M., 2013. Bieżące kierunki w kryminalistycznych badaniach dotyczących identyfikacji zwierząt należących do gatunków zagrożonych wyginięciem. *Probl. Kryminal.* 280(2), 28–31.
- Foran D.R., Hixson J.E., Brown W.M., 1998. Comparison of ape and human sequences that regulate mitochondrial DNA transcription and D-loop DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* 16, 5841–5861. DOI: 10.1093/nar/16.13.5841
- Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C., 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 77, 6715–6719. DOI: 10.1073/pnas.77.11.6715
- Haddrath O., Baker A.J., 2001. Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proc. R. Soc. Lond.* 268(2), 939–945. DOI: 10.1098/rspb.2001.1587
- Heise W., Bobik W., Kubisz P., Kajtoch Ł., 2015. A three-marker DNA barcoding approach for ecological studies of xerothermic plants and herbivorous insects from central Europe. *Bot. J. Linn. Soc.* 177(4), 576–592. DOI: 10.1111/boj.12261

- Herbert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M., 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology* 2(10), 312. DOI: 10.1371/journal.pbio.0020312
- Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R., Janke A., 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J. Mol. Evol.* 47, 441–448. DOI: 10.1007/PL00006401
- Hofreiter M., Pajmans J.L., Goodchild H., Camilla F., Speller C.F., Barlow A., Fortes G.G., Thomas A., Ludwig A., Collins M.J., 2014. The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts. *Bioessays* 36(2), 10–11. DOI: 10.1002/bies.201400160
- Hsieh H.M., Huang L.H., Tsai L.C., Liu C.L., Kuo Y.C., Hsiao C.T., Linacre A., Lee J.C., 2006. Species identification of *Kachuga tecta* using the cytochrome b gene. *J. Forensic Sci.* 51(1), 52–56. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2005.00004.x
- Hsieh H.M., Huang L.H., Tsai L.C., Tsai L.H., Kuo Y.C., Meng H.H., Linacre A., Lee J.C., 2003. Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene. *J. Forensic Sci.* 136(1), 1–11.
- Kelle J., Carmon J., Pucherelli S., Hosler D., 2014. Identification of Unknown Organisms by DNA Barcoding: A Molecular Method for Species Classification. *Tech. Memo.* 86(68220), 14–15.
- Korytko M., Łaczmajska I., 2016. Sekwencje mikrosatelitarne i ich wykorzystanie w diagnostyce medycznej. *Kosmos* 310(65), 11–16.
- Koseniuk A., Szumiec A., Rubiś D., Radko A., 2015. Różnice w budowie i funkcjonowaniu genomu mitochondrialnego i jądrowego. *Wiad. Zoot.* 53(2), 98–102.
- Lee J.C.-I., Hsieh H.M., Huang L.H., Kuo Y.C., Wu J.H., Chin S.C., Lee A.H., Linacre A., Tsai L.C., 2009. Ivory identification by DNA profiling of cytochrome b gene. *Int. J. Legal Med.* 123(2), 117–121. DOI: 10.1007/s00414-008-0264-0
- Lee J.C.-I., Tsai L.C., Huang M.T., Jhuang J.A., Yao C.T., Chin S.C., Wang L.C., Linacre A., Hsieh H.M., 2008. A novel strategy for avian species identification by cytochrome b gene. *Electrophoresis* 29, 2413–2418. DOI: 10.1002/elps.200700711
- Listos P., Dylewska M., Gryzińska M., 2016. Sprzeczný z Konwencją Waszyngtońską (CITES) przemýt zwierząt do Polski. *Życie Wet.* 91(4), 238–241.
- Malyarchuk B.A., Rogozin I.B., Berikov V.B., Derenko M.V., 2002. Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial control region. *Hum. Genet.* 111, 46–53. DOI: 10.1007/s00439-002-0740-4
- McGarth M., 2012. Wildlife crime profound threat to nations, says report BBC News, 12.12.2012. <https://www.bbc.com/news/science-environment-20679454>
- Meganathan P.R., Dubey B., Haque I., 2009. Molecular identification of crocodile species using novel primers for forensic analysis. *Conserv. Genet.* 10(3), 767–770. DOI: 10.1007/s10592-008-9658-2
- Moore M.K., Bemss J.A., Rce S.M., Quattro J.M., Woodley C.M., 2003. Use of restriction fragment length polymorphisms to identify sea turtle eggs and cooked meats to species. *Conserv. Genet.* 4(1), 95–103. DOI: 10.1023/A:1021881319271
- Pepin L., McEwing R., Carvalho G.R., Ogden R., 2008. A DNA – Based Approach for the Forensic Identification of Asiatic Black Bear (*Ursus thibetanus*) in a Traditional Asian Medicine. *J. Forensic Sci.* 53(6), 1358–1362. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2008.00857.x
- Prusak B., Grzybowski T., Gralak M., Grzybowski G., 2005. Przydatność analizy sekwencji genu cytochromu b mitochondrialnego DNA do określenia pochodzenia śladów biologicznych zwierząt i ludzi. *Med. Weter.* 61, 162–165.
- Rohilla M.S., Tiwari P.K., 2008. Restriction fragment length polymorphisms among five species of Indian freshwater turtles. *J. Appl. Genet.* 49(2), 167–182. DOI: 10.1007/BF03195610
- Romanowicz M., Podgórska Z., 2010. Badanie zaopatrzenia rynku internetowego oraz targów i sklepów specjalistycznych na terenie Warszawy w tradycyjną medycynę azjatycką oraz inne produkty zawierające części zwierząt i roślin chronionych Konwencją CITES. *WWF Polska, Światowy Fundusz na rzecz Przyrody*, ss. 24.



- Salas A., Bandelt H.J., Macaulay V., Richards M.B., 2007. Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci. Int.* 168, 1–13. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.05.037
- Skonieczna K., Bednarek J., Rogalla U., Woźniak M., Gorzkiewicz M., Linkowska K., Duleba A., Śliwka K., Grzybowski T., 2012. Wykorzystanie osiągnięć genomiki mitochondrialnej w badaniach genetyczno-sądowych opartych na analizie sekwencji ludzkiego mitochondrialnego DNA. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 62, 213–218.
- Skuza L., Demska K., Adamczyk A., 2015. Barkoding jako nowoczesne narzędzie biologii molekularnej. *Post. Biol. Kom.* 42(4), 621–632.
- Sloan D.B., Alverson A.J., Chuckalovcak J.P., Wu M., McCauley D.E., Palmer J.D., Taylor D.R., 2012. Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates. *PLoS Biology*, 10(1), 1371. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001241
- Tully L.A., Parsons T.J., Steighner R.J., Holland M.M., Marino M.A., Prenger V.L., 2000. A sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis assay reveals a high 133 frequency of heteroplasmy in hypervariable region I of the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 432–443. DOI: 10.1086/302996
- Ursing B.M., Arnason U., 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). *J. Mol. Evol.* 47, 302–306. DOI: 10.1007/PL00006388
- Ustawa z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody. *Dz.U.* 2004 Nr 92, poz. 880.
- Wan Q.H., Fang S.G., 2003. Application of species – specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. *Forensic Sci. Int.* 131(1), 75–78.
- Wetton J.H., Tsang C.S., Roney C.A., Spriggs A.C., 2004. An extremely sensitive species – specific ARMs PCR test for the presence of tiger bone DNA. *Forensic Sci. Int.* 140(1), 139–145.
- Wozney K.M., Wilson P.J., 2012. Real-time PCR detection and quantification of elephantid DNA; Species identification for highly processed samples associated with the ivory trade. *Forensic Sci. Int.* 219, 106–112. DOI: 10.1016/j.forsciint.2011.12.006
- Xu X., Arnason U., 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* 48, 357–362.

**Summary.** Species identification of animals carried out on the basis of molecular biology methods plays an increasingly important role in the practice of forensic laboratories around the world. In Poland, these methods are increasingly used to determine whether a species is protected under the provisions of the Act of 16.04.2004 “on nature protection”. This is due to the numerous cases of illegal trafficking of endangered species of animals, which concerns trade in live animals as well as products and items made from various parts of the body of these animals. In such cases, when identification based on the morphological characteristics of the species not possible, animal DNA analysis is of particular importance. The paper presents typical molecular markers used in animal species identification.

**Key words:** species identification, mitochondrial DNA, barcoding DNA

Otrzymano:/ Received: 16.04.2019  
Zaakceptowano:/ Accepted: 07.05.2019