



Latvijas šķirnes zirgu izcelšanās pārbaude pēc 17 mikrosatelītu praimeriem Parentage Determination by 17 Microsatellite Markers of Latvian Warmblood Horse

Agnese Viļuma, Daina Jonkus

LLU Agrobiotehnoloģijas institūts

Institute of Agrobiotechnology, LLU

e-mail: Daina.Jonkus@llu.lv

Abstract. The aim of the research was to determine whether the genetic resource – foal of Latvian warmblood horse – is the true descendant of alleged parents by using 17 microsatellite primers' method, and to consider if this method is appropriate for routine parentage testing and identification in genetic resources of Latvian warmblood horse. DNA was extracted from collected blood samples and amplified by PCR method. Horses' genotypes in 17 microsatellite loci (VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, HMS6, HTG7, HMS3, AHT5, ASB2, HTG10, HMS2, ASB23, ASB17, LEX3, HMS1, and CA425) were determined by analyzing the received electropherogram data with PeakScanner v.1.0 software. The diversity range of alleles was calculated as 7 alleles per locus. The diversity of alleles in these 17 loci varied from 5 alleles (HTG4, HTG7) to 11 alleles (ASB17). Exclusion probabilities calculated as 97.2%, 99.8% and 94.5%, depending on parentage testing case, confirmed the usefulness of this method for routine parentage testing and identification of Latvian warmblood horse.

Key words: genetic resource horse, parentage testing, microsatellites.

Ievads

Šobrīd viena no aktuālākajām tendencēm pasaulē ir dabas bioloģiskās daudzveidības saglabāšana. Turklāt tas tiek attiecināts ne tikai uz savvaļas dzīvnieku sugām, bet arī uz lauksaimniecības dzīvniekiem kā daudzpusīgas ģenētiskās informācijas nesējiem. Tāpēc FAO (Pārtikas un lauksaimniecības organizācija) ir izstrādājusi atbalsta programmas, kas paredz pēc iespējas dažādāku vietējo populāciju saglabāšanu (Protecting animal ..., 2009).

Latvijas zirgkopības lepnums – Latvijas zirgu šķirne – ir daļa no pasaules ģenētiskās daudzveidības un līdz ar to ir īpaši saglabājama. Jāņem vērā, ka svarīga ir šķirnes piemērotība mūsu klimata apstākļiem, universālais tips, daudzpusīgās izmantošanas iespējas, izturība, labdabība, spēcīgā kaulu uzbūve, labas barības izmantošanas spējas, auglība un ilgmūžība (Latvijas šķirnes ..., 2004).

Lai nodrošinātu nekļūdīgu un tālredzīgu selekcijas procesu, tā kontrolei daudzās pasaules valstīs tiek lietotas ģenētiskās metodes, ar kuru palīdzību nosaka un reģistrē katra ciltsgrāmatā iekļautā dzīvnieka

ģenotipu, kas savukārt palīdz identificēt dzīvniekus un noteikt paternitāti, lai novērstu cilvēku iespējamās kļūdas un ļaunprātīgu rīcību.

Lai arī Latvijā šobrīd zirgu identitāti un paternitāti ar ģenētiskajām metodēm nenosaka, pasaulē tās ir pazīstamas jau kopš pagājušā gadsimta beigām. Jaunās tehnoloģijas mūsdienās sniedz iespēju izmantot DNS mikrosatelītu priekšrocības ģenētisko testu veikšanā, kas šobrīd ir viena no perspektīvākajām un vieglāk standartizējamām metodēm.

DNS mikrosatelītus veido ļoti īsu sekvenču (līdz 13 bāzu pāru) tandēmi (viens otram sekojoši) atkārtojumi (Watson, Baker et al., 2008).

DNS mikrosatelīti pieder kodominantajai DNS marķieru klasei un iedzimst pēc Mendeļa likumiem. Tie ir vienmērīgi izplatīti pa visu eikariotu šūnu kodola genomu un ir izteikti polimorfi. Mikrosatelītu iedzimšanas mehānisms, nododot tos no vienas paaudzes nākamajai, ir ļoti vienkāršs un stabils, un to neietekmē neviens cits faktors kā tikai iedzimtība. Katram mikrosatelītu lokusam ir raksturīgas dažādas alēles (lokusa DNS sekvenču alternatīvas formas).

Kumeļš vienu alēli manto no tēva un otru no mātes. Niecīgo izmēru dēļ mikrosatelīti ir viegli amplificējami ar PCR (polimerāzes ķēdes reakcija) metodēm un līdz ar to ir viegli izmantojami un precīzi palīgi ģenētiskās informācijas noteikšanas un analizēšanas procesā (Georgescu, Vatasescu et al., 2007).

Īpaši zirgkopībai piemēroti mikrosatelīti pirmo reizi aprakstīti 1992.–1994. gadā. Pētījumus veica divas pētnieku grupas: viena – zinātnieka Ellegrena vadībā (1992. g.), otra – zinātnieka Marklunda vadībā (1994. g.). Šiem zinātniekiem pirmajiem izdevās izolēt dinukleotīdu (CA)_n atkārtojumu kopumu un pierādīt, ka arī zirgiem ir raksturīgs izteikts mikrosatelītu polimorfisms (Seyedaabadi, Amirina et al., 2006).

Mūsu pētījuma mērķis: noskaidrot mikrosatelītu praimeru metodes piemērotību ģenētisko resursu programmā iekļauto Latvijas šķirnes zirgu paternitātes un identitātes noteikšanai.

Materiāls un metodes

Latvijas šķirnes ģenētisko resursu zirgu ģimeņu (bērns – tēvs – māte) asins paraugus ievāca speciālos, EDTA (etilēndiamīna tetra acetāta) buferšķīdumu saturēšos vakutaineros. Kopā pētījumā bija iesaistīti

A gadījumā:

$$P = 1 - 2 \sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^3 + 2 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3$$

B gadījumā:

$$P = 1 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^6 - 8 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 8 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \left(\sum_{i=1}^n p_i^3 \right) + 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^3 \right)^2$$

C gadījumā:

$$P = 1 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^2 + 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^3 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^4$$

26 zirgi, randomi izvēlēti no dzīvnieku novietnēm Latvijas teritorijā. DNS izdalīšanu veica LLU Lauksaimniecības fakultātes Molekulārās ģenētikas pētījumu laboratorijā, izmantojot firmas „Fermentas” (Lietuva) komerciālo reaģentu komplektu pēc ražotāja norādījumiem.

Amplificēšanai izmantoja „StockMarks® Applied Biosystems” komerciālo reaģentu komplektu ar 17 mikrosatelītu luminiscentajiem praimeriem. Šis komplekts papildus tradicionālajiem 12 lokusiem (VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, HMS6, HTG7, HMS3, AHT5, ASB2, HTG10, HMS2) satur 5 papildu lokusus – ASB 17, LEX3, HMS1, CA425 un ASB23. Katram lokusam ir paredzēts praimeru pāris, kur viens no praimeriem iezīmēts ar fluoriscējošu krāsvielu. Reaģentu komplektā tika

izmantotas 4 praimeru fluoriscentās iezīmes – 6-FAM (zila), VIC (zaļa), NED (dzeltēna) un PET (sarkana). Papildus izmantoja LIZ (oranža) iezīmi izmēru standarta noteikšanai.

Amplificētos mikrosatelītus nosūtīja uz Latvijas Valsts mežzinātnes institūta „Silava” laboratoriju sekvenēšanai. Saņemtos datus analizēja ar programmu „PeakScanner v1.0”. Pēc iegūtajām elektroferogrammām noteica pētāmo zirgu genotipus un alēļu daudzveidību.

Paternitātes noteikšanas metodes lietderības pamatā ir varbūtība, ar kuru iespējams izslēgt nepatieso radinieku, izmantojot konkrēto metodi. Galvenokārt nākas saskarties ar trīs gadījumiem:

A) zināmi abu vecāku genotipi un jāizslēdz viens no vecākiem;

B) zināmi abu vecāku genotipi un jāizslēdz abi vecāki;

C) zināms viena vecāka un pēcnācēja genotips un jāizslēdz to radniecība.

Izslēgšanas varbūtību rēķināja, balstoties uz lokusu individuālajām un kopējām alēļu frekvencēm pēc ISAG (Starptautiskā dzīvnieku ģenētikas komiteja) rekomendētajām formulām (Jamieson, 1997):

kur

p_i – alēļu frekvence.

Savukārt alēļu frekvences katram lokusam aprēķināja pēc formulas:

$$p_i = \frac{n_i}{N},$$

kur

n_i – konkrētās alēles atkārtojumu skaits;

N – kopējais alēļu skaits lokusā.

Aprēķinu rezultātā ieguva skaitli (parasti izteikts procentos), kas rāda, kāda ir nepatiesa vecāka iespējamā izslēgšanas varbūtība, izmantojot šo metodi.

Rezultāti un diskusija

Rezultātu analīze veikta, balstoties uz iegūtajiem elektroferogrammu datiem (1. att.). Visus 17 mikrosatelītu lokusus sagrupēja četrās grupās atbilstoši praimeru krāsvielām: 1. grupa – zilās krāsas lokusi, 2. grupa – zaļās krāsas lokusi, 3. grupa – dzeltenās krāsas lokusi, 4. grupa – sarkanās krāsas lokusi. Uz vertikālās ass var nolasīt katras alēles fluoriscentā signāla spēcīgumu, ko izsaka relatīvās fluoriscences vienībās, bet uz horizontālās ass nolasāmi alēļu lielumi bāzu pāros (bp) (Horse, cattle ..., 2007).

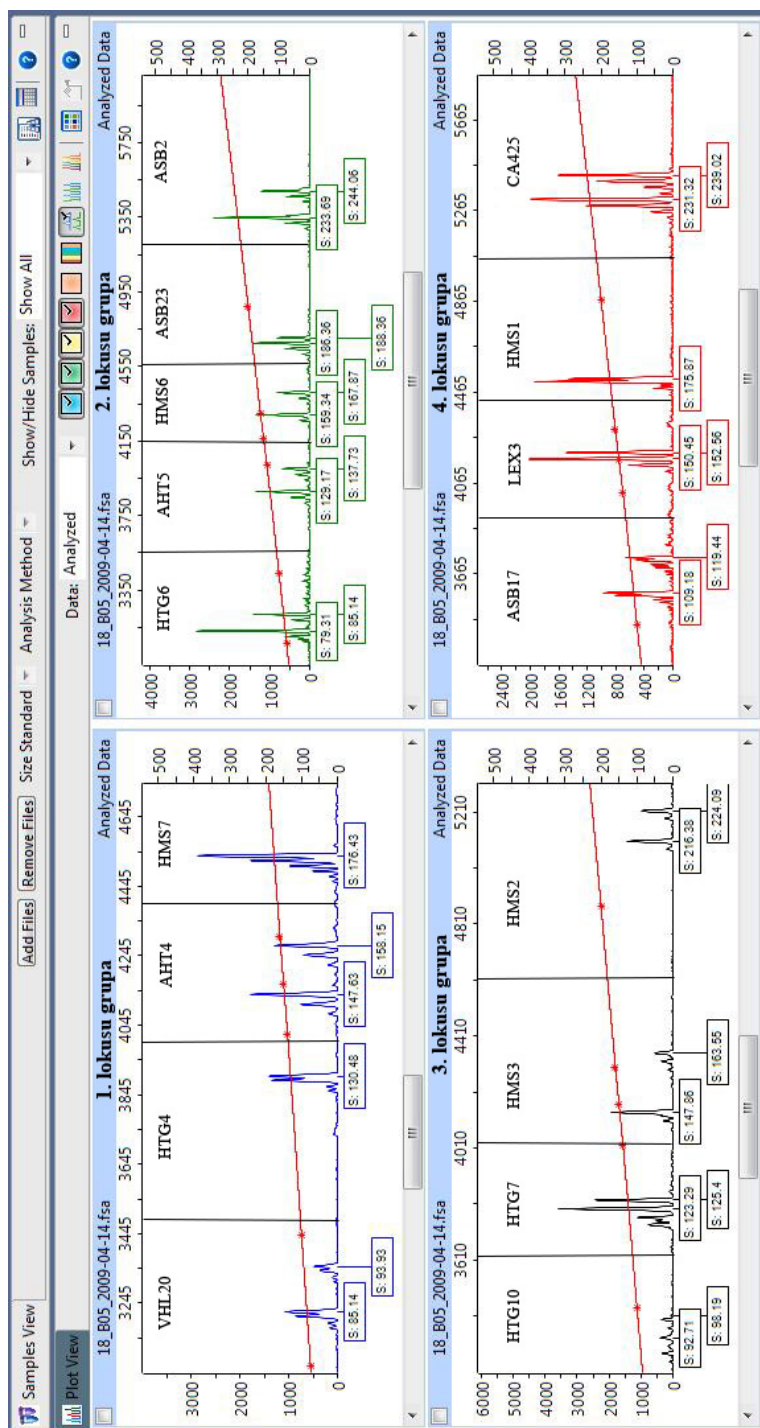
Analizēto ģenētisko resursu programmā iekļauto zirgu genotipos vidējā alēļu daudzveidība bija

7 alēļu veidi lokusā. Mikrosatelītu mainība Latvijas šķirnes zirgu pētāmajā grupā variēja no 5 dažādiem mikrosatelītiem HTG4 un HTG7 lokusā līdz 11 dažādiem mikrosatelītiem ASB17 lokusā. No iegūtajiem datiem secinājām, ka piemērotākie lokusi paternitātes noteikšanai pēc alēļu daudzveidības kritērija varētu būt ASB2, HTG10, HMS3, ASB17, LEX3 un CA425 (alēļu skaits lielāks par vidējo vērtību). Būtisks kritērijs ir arī alēļu atkārtošanās biežums katrā lokusā – jo vienmērīgāks tas ir, jo piemērotāks šāds lokuss ir paternitātes noteikšanai. Pēc šī faktora piemērotākie lokusi bija HTG10, HMS2 un LEX3. Dažiem lokusiem ar augstu polimorfisma pakāpi (HTG6,

1. tabula / Table 1

Alēļu variantu daudzveidības salīdzinājums dažādām zirgu šķirnēm
Comparison of the diversity of alleles of different horse breeds

Lokuss / Locus	Latvijas zirgu šķirne / Latvian warmblood horse	Žemaitukai / Zemaitukai	Smagā tipa Žemaitukai / Heavy type Zemaitukai	Lietuvas smagais braucamzirgs / Lithuanian heavy draught	Tīrasiņu jājamzirgs, Koreja / Thoroughbred horse, Korea	Malopolski, Polija / Malopolski, Poland	Bilgorai, Polija / Bilgoraj, Poland	Hucul, Slovākija / Hucul, Slovak Republic	Lusitano, Portugāle / Lusitano, Portugal	Sorraia, Portugāle / Sorraia, Portugal	Garrano, Portugāle / Garrano, Portugal
VHL20	6	6	8	8	5	7	6	9	10	5	10
HTG4	5	6	5	5	5	5	4	5	7	4	6
AHT4	6	5	8	7	5	6	7	7	–	–	–
HMS7	7	3	6	6	6	7	4	6	8	3	7
HTG6	7	6	5	5	–	6	6	6	–	–	–
AHT5	7	6	7	8	5	6	8	7	–	–	–
HMS6	7	4	5	6	6	5	8	7	–	–	–
ASB23	7	6	6	8	6	–	–	–	–	–	–
ASB2	9	6	6	7	8	10	7	9	11	5	9
HTG10	9	5	7	8	8	8	6	9	9	2	9
HTG7	5	4	3	4	–	4	5	4	–	–	–
HMS3	8	5	7	6	7	7	6	7	8	2	8
HMS2	6	6	5	7	–	7	4	5	–	–	–
ASB17	11	8	9	9	9	–	–	–	–	–	–
LEX3	7	6	6	9	8	–	–	–	–	–	–
HMS1	7	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–
CA425	8	–	–	–	7	–	–	–	–	–	–
Vidēji / Average	7.18	5.47	6.20	6.87	6.29	6.50	5.92	6.75	8.83	3.50	8.17



1. att. Kumeļa Adele mikrosatelītu alēļu lielumi programmā PeakScanner.

Šī kumeļa mikrosatelītu genotips ir heterozigots pēc diviem 1. grupas lokusiem (VHL20 un AHT4), pēc visiem 2. un 3. grupas lokusiem un pēc trīs 4. grupas lokusiem (ASB17, LEX3 un CA425), savukārt homozigots tikai pēc diviem 1. grupas lokusiem (HTG4) un viena 4. grupas lokusa (HMS1).

Fig. 1. Sizes of microsatellite alleles of foal Adele in PeakScanner software.

The foal's genotype shown in this figure is heterozygous by two loci in group 1 (VHL20 and AHT4), by all loci in groups 2 and 3, and by three loci in group 4 (ASB17, LEX3, and CA425), whereas homozygous only by two loci in group 1 (HTG4) and one locus in group 4 (HMS1).

HMS3, CA425) pētījumā novēroja raksturīgu negatīvu iezīmi – pārsvarā dominēja divi alēļu veidi ar biežu atkārtotošanos, bet pārējās alēles bija sastopamas tikai retos gadījumos. Iespējams, ka pētāmās grupas paplašināšanas gadījumā situācija varētu mainīties.

Tā kā šāda veida pētījums Latvijas šķirnes zirgiem tika veikts pirmo reizi, labākais veids, kā izvērtēt alēļu daudzveidības rādītājus, bija iegūto rezultātu salīdzināšana ar citu zirgu šķirņu rādītājiem (1. tabula). Salīdzināšanai izmantojām literatūrā pieejamos datus, kas raksturo trīs Lietuvas zirgu šķirnes – Žemaišus, smagā tipa Žemaišus un Lietuvas braucamzirkus (Juras, Cothran, 2004), kā arī Korejas Tīrasiņu jājamzirkus (Lee, Cho, 2006), Polijas Malopolski un Bilgoraj zirkus (Zabek, Nogaj et al., 2005), Slovākijas Hucul zirkus (Trandžik, Židek et al., 2007) un Portugāles Lusitano, Sorraia un Garrano zirkus (Luis, Cothran, Oom, 2002).

Salīdzinot ar Lietuvas, Korejas Tīrasiņu jājamzirkus un Polijas un Slovākijas zirgu šķirnēm, Latvijas šķirnes zirgu pētāmajai grupai bija raksturīga lielāka alēļu vidējā daudzveidība. Portugāles zirgu šķirnēm Lusitano un Garrano vidējais alēļu skaits bija lielāks, ko, iespējams, varētu skaidrot ar to, ka Portugālē veiktajā pētījumā mērķtiecīgi tika izvēlēti 6 lokusi, kuri šīm šķirnēm sastopami ar visaugstāko polimorfisma pakāpi.

Tāpat kā Latvijas šķirnes zirgu pētāmajai grupai, arī pārējo šķirņu populācijām lokusam ASB17 bija visaugstākā daudzveidība. Pēc literatūras datiem Hucul, Lusitano un Garano šķirnēm arī zilās krāsas lokusam VHL20 bija augsta polimorfisma pakāpe (9-10 alēles), taču Latvijas šķirnes zirgu pētāmajai grupai šādu tendenci nenovērojām.

Aprēķinot nepatiesā radnieka izslēgšanas varbūtību, noskaidrojām, ka visaugstākā izslēgšanas varbūtība bija abu vecāku izslēgšanas gadījumā – 99.8%. Ar izslēgšanas rādītājiem

2. tabula / Table 2

Paternitātes noteikšanas piemērs
Example of parentage determination

Lokuss / Locus	Māte / Mother		Kumeļš / Foal		Tēvs I / Father I		Tēvs II / Father II	
	I alēle / Allele I	II alēle / Allele II	I alēle / Allele I	II alēle / Allele II	I alēle / Allele I	II alēle / Allele II	I alēle / Allele I	II alēle / Allele II
VHL20	I*	O	I	N	H	N*	M	M
HTG4	L	M*	M	M	K	M*	M*	M
AHT4	J	K*	I	K	I*	I	H	O
HMS7	L*	O	L	N	N*	N	J	L
HTG6	J	P*	P	P	O	P*	O	P*
AHT5	I	O*	O	O	L	O*	K	K
HMS6	L	P*	P	P	P*	Q	N	P*
ASB23	K*	L	K	K	K*	S	L	S
ASB2	M*	O	M	N	N*	P	M	Q
HTG10	I	L*	K	L	H	K*	L	O
HTG7	M*	O	M	O	O*	O	N	O*
HMS3	P	P*	P	P	P*	S	P*	P
HMS2	L	M*	L	M	L*	L	L*	R
ASB17	M	M*	M	R	R*	R	M	M
LEX3	H	K*	I	K	I*	H	F	M
HMS1	J	J*	I	J	I*	M	K	M
CA425	N	O*	J	O	J*	O	N	N
Slēdziens / Conclusion					Pozitīvs / Positive		Negatīvs / Negative	

* Vecāku alēles, kas atbilst kumeļa genotipā esošajām alēlēm. / Alleles of parents, which correspond to alleles in the foal's genotype.

apstiprinājās pieņēmums, ka precīzāka viena vecāka izslēgšana iespējama tādā gadījumā, ja zināmi abu vecāku genotipi (97.2%). Taču arī viena vecāka izslēgšana, nezinot otra vecāka genotipu, bija ar pietiekami augstu varbūtību (94.5%), lai varētu izdarīt korektu slēdzienu.

Vislabākie izslēgšanas varbūtības rādītāji bija zaļās grupas lokusam ASB2 (65.1%), dzeltenās grupas lokusiem HTG10 (64.8%) un HMS2 (61.5%) un sarkanās grupas lokusiem ASB17 (67.6%) un LEX3 (67.4%). Savukārt vissliktākie izslēgšanas varbūtības rādītāji šajā pētījumā bija zilās grupas lokusiem VHL20, HTG4, AHT4 un HMS7 (43.0–56.8%).

Katram lokusam ir individuāli starptautiski noteikti alēļu alfabētiskie nosaukumi (Haeringen, Goor et al., 1998), kas vienkāršo alēļu noteikšanu un ļauj veikt dažādu šķirņu savstarpēju ģenētiskās daudzveidības salīdzināšanu. No lokusa noteiktas vidus alēles M, kas ir individuāla katram lokusam, uz abām pusēm alfabētiskā secībā tiek nosauktas pārējās alēles ar 2 bp soli (Trandžik, Židek et al., 2007). Pamatojoties uz šiem alēļu nosaukumiem, tiek veidoti cilvēkiem saprotami zirgu genotipu raksturojumi. Ar šāda veida analizēm zirgu audzētāju asociācijas varētu veiksmīgi kontrolēt zirgu audzētāju sniegtās informācijas patiesumu. Savukārt audzētājiem tā palīdzētu atrisināt gadījumus, kad ķēve tikusi lecināta ar vairākiem vaisliniekiem un nav 100% drošas informācijas par kumeļa īsto tēvu. Turklāt katra zirga unikālais genotips var kalpot par identitāti apstiprinošu faktoru (papildus jau ierastajam zirga pazīmēm) un būtu ievietojams zirga pasē. Metodes pielietojuma detalizētākai izpratnei 2. tabulā apskatīts gadījums, kurā jānosaka, kurš no diviem iespējamiem tēviem ir kumeļa īstais bioloģiskais tēvs. Pirmā vaislinieka (tabulā – Tēvs I) un kumeļa genotipā atrodamas identiskas alēles visos 17 lokusos, tātad šis vaislinieks ir kumeļa tēvs. Savukārt otra vaislinieka (tabulā – Tēvs II) genotipā atrodamas tikai 6 kumeļam raksturīgās alēles, līdz ar to šī vaislinieka iespējamā paternitāte ir pilnībā izslēgta.

Lai ekonomētu finansiālos līdzekļus, darbu un laiku, nav nepieciešams visiem zirgiem veikt genotipēšanu tieši pēc 17 mikrosatelītu lokusiem. Piemēram, Francijas jājamzirgu vaislinieka genotipa kartē ir iekļauta ģenētiskā informācija, kas sastāv no 12 mikrosatelītu lokusiem (Labogena, 2004), bet Portugāles zirgu šķirņu (Sorraia, Gorrano, Lusitano) ģenētiskai raksturošanai izvēlēti 6 lokusi ar augstāko polimorfisma pakāpi (Luis, Cothran, Oom, 2002).

Attiecīgi arī Latvijas zirgu šķirnei būtu jāveic pētījumi ar lielāku paraugkopu un jānoskaidro šai populācijai vispiemērotākie lokusi paternitātes un identitātes noteikšanai.

Secinājumi

Pēc iegūtajiem elektroferogrammu datiem ir iespējams apstiprināt vai izslēgt gan paternitātes, gan maternitātes gadījumus.

Piemērotākie lokusi paternitātes noteikšanai pēc alēļu daudzveidības kritērija Latvijas zirgu šķirnē bija ASB2, HTG10, HMS3, ASB17, LEX3 un CA425.

Gadījumos, kad izslēgšanas procesā nebija zināms otra vecāka genotips, izslēgšanas varbūtība samazinājās par 2.7%.

Aprēķinātās izslēgšanas varbūtības (94.5–99.8%) apstiprināja šīs metodes lietderību Latvijas zirgu šķirnes paternitātes un identitātes noteikšanai.

Literatūra

1. Georgescu, S.E., Vatasescu, R.A., Rebedea, M., Dinischiotu, A., Costache, M. (2007) Molecular genetics approaches in farm animals in Romania. *Biotechnology in Animal Husbandry*, No. 23(5-6), 11–18.
2. Haeringen, W. A., Goor, L. H. P., Hout, N., Lenstra, J. A., Haerigen, H. A. (1998) Polymorphic horse microsatellite locus: VHL150. *Animal Genetics*, No. 29 (6), p. 464.
3. *Horse, Cattle and Dog Genotyping Kits Protocol*. (2007) Applied Biosystems, StockMarks, 72 pp.
4. Jamieson, A. (1997) Exclusion probability in parentage tests: http://www.isag.org.uk/Docs/Exclusion_probability.pdf – Resurss aprakstīts 2009. gada 9. septembrī.
5. Juras, R., Cothran, E. G. (2004) Microsatellites in Lithuanian native horse breeds: usefulness of parentage testing. *Biologia*, No. 4, 6–9.
6. Labogena. (2004) Genetic analysis laboratory for animal species: http://genomics.aquaculture-europe.org/fileadmin/Aquafunc/doc/Aquagenome_Workshop/21_labogena.pdf – Resurss aprakstīts 2009. gada 9. septembrī.
7. Latvijas šķirnes zirgu braucamā tipa ciltsdarba programma 2004.–2009. gadam. (2004) *Ciltsdarba normatīvie dokumenti*. 4. sējums. Latvijas Republikas Zemkopības Ministrija, 127–137.
8. Lee, S. Y., Cho, G. J. (2006) Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite

- DNA typing. *Journal of Veterinary Science*, No. 7, 63–67.
9. Luis, C., Cothran, E., Oom, M.M. (2002) Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness of parentage testing. *Genetics of Molecular Biology*, No. 25, 131–134.
 10. Protecting animal genetic diversity for food and agriculture. Time for action: <http://www.fao.org/ag/magazine/pdf/angr.pdf> – Resurss aprakstīts 2009. gada 9. septembrī.
 11. Seyedaabadi, H., Amirina, C., Banabazi, M.H., Emrani, H. (2006) Verification of Iran Caspian horse using microsatellites markers. *Iranian Journal of Biotechnology*, Vol. 4, No. 4, 260–264.
 - Trandžik, J., Židek, R., Jakabova, D., Buleca, J., Massanyi, P., Haško, M., Kozlik, P. (2007) Genetic diversity of Hucul horse, based on microsatellite data in Slovak Republik: [http://www.raumberg-gumpenstein.at\(4w_2007_dagene_trandzik.pdf\)](http://www.raumberg-gumpenstein.at(4w_2007_dagene_trandzik.pdf)) – Resurss aprakstīts 2009. gada 9. septembrī.
 12. Zabek, T., Nogaj, A., Radlko, A., Nogaj, J., Slota, E. (2005) Genetic variation of Polish endangered Bilgoraj horses and two common horse breeds in microsatellite loci. *Journal of Applied Genetics*, No. 46, 299–305.
 13. Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. (2008) *Molecular biology of the gene 6th edition*. New York, CSHL Press, 143 pp.