



ARAŞTIRMA MAKALESİ

PZR metoduyla atlarda birey ve ebeveyn tayini

Mehmet Nizamlioğlu^{1*}, Ercan Kurar^{2,4}, Zafer Bulut¹, Şeref İnal³, Ferudun Erzurum⁵

Özet

Nizamlioğlu M, Kurar E, Bulut Z, İnal Ş, Erzurum F. PZR metoduyla atlarda birey ve ebeveyn tayini. *Eurasian J Vet Sci*, 2012, 28, 2, 77-81

Amaç: Atlarda ebeveyn tayininde kullanılabilecek bir mikrosatellit panelini geliştirmek ve test etmektir.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada 4 farklı at ırkından 189 adet kan örneği toplandı. Beş adet mikrosatellit markörü kullanılarak, izolasyonu yapılan genomik DNA örnekleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metoduyla çoğaltıldı ve PZR ürünleri poliakrilamid jellerde ayrıştırıldı. Standart bir DNA ladder yardımıyla alleller tanımlandı.

Bulgular: Locus başına 9-13 arasında değişen, toplam 53 farklı allel tanımlandı. Gözlenen (H_o) ve beklenen heterozigotluk (H_e) değerleri sırasıyla 0.496-0.880 ve 0.800-0.851 arasında bulundu. Polymorphism Information Content değerleri ise 0.774-0.832 arasında gözlemlendi. Dışlama gücü (DG) değerleri 0.619-0.702 arasında gözlemlenirken, toplam DG 0.99060 olarak bulundu.

Öneri: Kullanılan test panelinin Türkiye'de ebeveyn tayininde kullanılabileceği ve hatalı sonuçları azaltmak için kullanılan mikrosatellit sayısının artırılmasının faydalı olacağı kanaatine varıldı.

Abstract

Nizamlioglu M, Kurar E, Bulut Z, Inal S, Erzurum F. Individual and parentage testing in horses by PCR methodology. *Eurasian J Vet Sci*, 2012, 28, 2, 77-81

Aim: The objective of this study was to develop and test a microsatellite panel for parentage analysis in horses.

Materials and Methods: A total of 189 blood samples were collected from four different horse breeds in Turkey. We selected five horse microsatellite loci and used to amplify genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR). The resulting PCR products were separated on polyacrylamide gels. Allele identification was conducted based on their base-pair size by comparing a size standard.

Results: A total of 53 alleles was determined ranging from 9 to 13 at each locus. The observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were ranged from 0.496 to 0.880 and from 0.800 to 0.851, respectively. Polymorphism information content (PIC) values were observed between 0.774 and 0.832. Power of exclusion (PE) at each microsatellite locus ranged from 0.619 to 0.702, resulting in a total PE value of 0.99060.

Conclusion: These results indicate that this set of microsatellite is useful for horse parentage testing in Turkey. Due to possible high level of inbreeding in some breeds, the use of increased number microsatellite loci will thereby be appropriate for avoiding a false parenting and misidentification.

¹Biyokimya Anabilim Dalı, ²Genetik Anabilim Dalı, ³Zootekni Anabilim Dalı, Veteriner Fakültesi, ⁴İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK), Selçuk Üniversitesi, 42075 Konya, ⁵Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal İşletmeler Genel Müdürlüğü, 06100, Ankara, Türkiye
Geliş: 14.03.2012, Kabul: 10.04.2012

*mnmzoglul@selcuk.edu.tr

Anahtar kelimeler: At, mikrosatellit, ebeveyn testi

Keywords: Horse, microsatellite, parentage

► Giriş

Günümüzde numaralandırma, kimlik ve verimle ilgili kayıtların büyük bir özenle tutulduğu ülkelerde dahi hatalı kimliklendirme oranı oldukça yüksektir. Sportif amaçlı kullanılmasından dolayı ekonomik bir öneme sahip olan at yetiştiriciliğinde, doğru akrabalık ilişkisinin tespiti önemlidir. Bu amaçla farklı markör sistemleri geliştirilmiştir. Markör sistemlerinin basit Mendel kalıtımı göstermesi, allellerinin hayatın tüm evrelerinde kolayca tespit edilebilmesi ve çevresel faktörlerden etkilenmemesi gerekmektedir.

Kimliklendirme ve popülasyonların moleküler düzeyde analizi amacıyla 15 adet kan ve protein polimorfizm sistemini içeren paneller yaygın olarak kullanılmış olup (Bowling ve Clark 1985, Luis ve ark 2002), yüksek oranda dışlama gücü (%97-99) elde edilebilmiştir (Bowling ve ark 1997). Ancak kan gruplarının belli kromozomlar üzerinde yoğunlaşması, doğaları gereği polimorfizm oranlarının nispeten düşük olması, taze kan örneklerine olan ihtiyaç, her marker sisteminin spesifik sarf malzeme gereksinimi, kısmen iş yükünün ağır olması ve testlerin uzun zaman alması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Kurar 2001). Dolayısıyla zaman içerisinde yerlerini DNA temelli markör sistemlerine bırakmışlardır.

Mikrosatellitler, 1-6 bç'lik tekrar dizileridir ve memeli genomlarında yaygın olarak bulunmaları, kodominant özellikleri, yüksek polimorfizm ve enformatif değerleri ve allel genotiplerinin PZR teknolojisi yardımıyla kolayca tespit edilebilmesi nedeniyle genetik ve popülasyon genomu çalışmaları yaygın olarak kullanılmaktadır (Goldstein ve Schlotterer 1998).

Sunulan çalışmada, mikrosatellit markörleri kullanılarak atlarda birey ve ebeveyn tayinlerinde kullanılacak bir DNA test paneli geliştirilmeye çalışılmıştır.

► Gereç ve Yöntem

Çalışmada, Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü (TİGEM) (Bursa-Karacabey, Eskişehir-Çifteler, Malatya-Sultansuyu) ve Kara Kuvvetleri Komutanlığı (KKK)'na ait Arap (n=129), Freizen (n=19), İngiliz (n=28) ve Yarım Kan İngiliz (n=13) popülasyonlarından toplam 189 adet hayvandan kan örnekleri alındı.

Kan örneklerinden standart fenol/kloroform yöntemi (Sambrook ve ark 1989) ile DNA izolasyon işlemi yapıldı. Mikrosatellit lokusları (Tablo1) daha önce yayınlanmış olan at gen haritalarından ve ISAG ile FAO MoDAD tarafından tavsiye edilen listeden (Lindgren

ve ark 1998, Kiguwa ve ark 2000, Hoffmann ve ark 2004) seçildi. PZR protokolü 1x Mg⁺⁺ free PCR buffer (Fermentas), 200 uM dNTP (Fermentas), 1.5-3.0 mM MgCl⁺⁺ (Tablo 1), 0.375 ünite *Taq* polimeraz (Fermentas), 5 pmol her bir primer çifti (Tablo 1), 0.05 µL dATP (α-³³P) ve 50 ng template DNA kullanılarak toplam 15 µL hacimde hazırlandı. Touchdown PZR profili (Özşensoy ve ark 2010) uygulanarak MJ Research PTC-200 Thermal Cycler'da gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri % 1.5'luk agaroz jel ile tespit edildikten sonra, Bulut ve ark (2004) tarafından belirtildiği şekilde poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile paralel yürütülen DNA standardı (DNA Sequencing Kit) kullanılarak genotipler belirlendi.

Mikrosatellit lokuslarına ait popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik çeşitlilik, Hardy-Weinberg Dengesi (HWE)'nden sapma, beklenen (He) ve gözlenen (Ho) heterozigotluk düzeyleri, Wright's-F istatistik değerleri, dışlama gücü (Power of Exclusion; PE), Polymorphism Information Content (PIC) değerlerinin hesaplanmasında ve Faktöriyel birleştirici analizlerinde (Factorial Correspondence Analysis, FCA) GENETIX 4.0 (Belkhir ve ark 1996-2000) ve Cervus 2.0 programları (Marshall ve ark 1998) kullanıldı. Komşu birleştirme ağacı (NJ; Neighbor-Joining Tree) D_A parametreleri ile Populations 1.0 programı (<http://www.cnrs-gif/pge/bioinfo/populations>) kullanılarak çizildi.

► Bulgular

Genel popülasyon parametrelerinden gözlemlenen allel sayıları (Na), Ho, He, PIC, PE ve HWE sapma değerleri Tablo 2'de gösterildi. Ortalama allel sayısı 10.6 olup en yüksek (13) HTG10 en az (9) ise HMS02 ve AHT4 lokuslarında olmak üzere toplam 53 farklı allel belirlendi (Tablo 2). Arap (8), Freizen (1), İngiliz (1) ve Yarım Kan İngiliz (2) at popülasyonlarında toplam 12 adet popülasyona özgü (private) allel tespit edildi. Ortalama He 0.832 olarak belirlenmiş olup 0.800 (HMS02) ve 0.851 (HMS06) arasında değiştiği gözlemlendi. Ortalama Ho değeri 0.662 olarak belirlenmiş olup 0.496 (HMS02) ve 0.880 (HTG10) arasında değişmektedir (Tablo 2). Bütün popülasyonlarda kullanılan lokuslar bakımından HWE'den sapma olduğu belirlendi. Toplam dışlama gücü (DG) değerleri ise bir ebeveyn varlığında (DG-1) 0.9680, iki ebeveyn varlığında (DG-2) ise 0.9960 olarak tespit edildi (Tablo 2).

Popülasyonlar için hesaplanan F_{IS} değerleri LEX33 (0.136), HMS06 (0.102), HMS02 (0.091) HTG10

Tablo 1. Çalışmada kullanılan mikrosatellit lokusları.

Lokus	Kromozom	Primer Sekansı (F)	Primer Sekansı (R)	MgCl ⁺⁺
LEX33	4	tttaaatcaaggattcagttg	tttctcttcaggtgcttc	2.0
HMS06	4	gaagctgccagttcaaccattg	ctccatctgtgaagtgaactca	1.5
HMS02	10	acgggtggcaactccaaggaag	cttgagctcgaatgtgtattaatg	1.5
HTG10	21	caattcccccccccccgca	ttttattctgatctgtcacatt	1.5
AHT04	24	aaccgctgagcaaggaagt	cccagagagttaccct	3.0

Tablo 2. Populasyonlarda görülen genetik çeşitlilik.

Lokus	Na	Ho	He	PIC	DG-1	DG-2	HWE
LEX33	11	0.649	0.837	0.814	0.500	0.671	p<0.001
HMS06	11	0.638	0.851	0.832	0.538	0.702	p<0.001
HMS02	9	0.496	0.800	0.774	0.442	0.619	p<0.001
HTG10	13	0.880	0.838	0.818	0.513	0.682	p<0.001
AHT04	9	0.679	0.834	0.811	0.497	0.668	p<0.001
Ortalama	10.6	0.662	0.832	0.810	0.4980	0.6680	-
Toplam	53	-	-	-	0.9680	0.9960	-

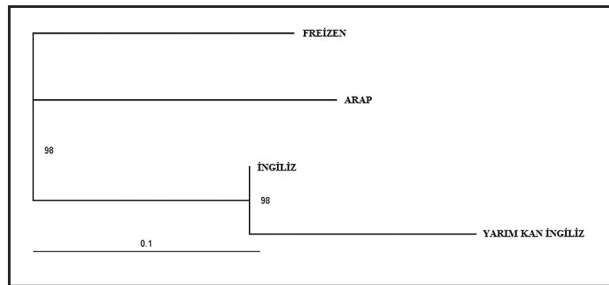
(0.212) ve AHT04 (0.162) lokusları için istatistiksel olarak önemli ($p<0.001$) olduğu belirlendi. Genel F_{IS} değerinin (0.141) istatistiksel olarak önemli ($p<0.001$) olduğu gözlemlendi. Bu değerler ışığında bütün lokuslar açısından HWE'den sapma olduğu belirlendi. Populasyonlar arası varyasyonun tespiti amacıyla hesaplanan F_{ST} değerlerinin 0.024 ile 0.201 arasında değiştiği gözlemlendi. Bütün lokuslar için hesaplanan F_{ST} değerinin (0.124) istatistiksel olarak önemli olduğu ($p<0.001$) belirlendi (Tablo 3).

Tablo 3. F_{ST} (Alt diagonal) ve D_A (Üst diagonal) değerleri tablosu.

Populasyon	Arap	Freizen	İngiliz	Yarım Kan İngiliz
Arap		0.364	0.227	0.399
Freizen	0.167***		0.325	0.494
İngiliz	0.092***	0.137***		0.166
YarımKan İngiliz	0.144***	0.201***	0.024 ^{ns}	

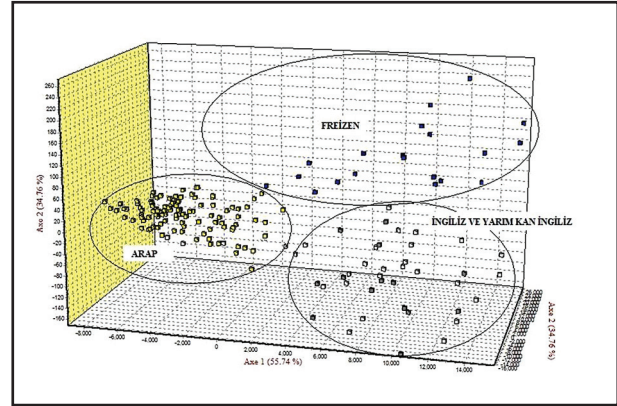
(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değil)

Nei'nin (1987) D_A genetik uzaklık değerleri (Tablo 3) kullanılarak çizilen NJT ağacında Arap ve Freizen populasyonları farklı birer grup, İngiliz ve Yarım Kan İngiliz populasyonları ise birlikte bir grup oluşturmuştur (Şekil 1). FCA grafiğinde de NJT metodunu (Şekil 1) destekler nitelikte Arap ve Freizen ırklarının farklı birer küme oluşturduğu, İngiliz ve Yarım Kan İngiliz at ırklarının ise birlikte kümelendiği görülmektedir (Şekil 2).

Şekil 1. Neighbor Joining metodu ile D_A ölçütü kullanılarak çizilen ağaç (NJT).

► Tartışma

Genetik çeşitliliğin temel göstergelerinden olan allel sayısı (Na), benzer çalışmalara (Tozaki ve ark 2003,



Şekil 2. Arap (sarı), Freizen (mavi), İngiliz (Beyaz) ve Yarım Kan İngiliz (Gri) populasyonlarına ait FCA grafiği.

Giacomoni ve ark 2008, DeAssis ve ark 2009) göre daha yüksek bulunmuştur. Diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığı zaman genel olarak benzer ortalama Ho (0.832) ve He (0.662) değerleri gözlenmiştir. DeAssis ve ark (2009) 9 mikrosatellit lokusu kullandıkları bir çalışmada aynı değerleri sırasıyla 0.637 ve 0.711 olarak belirtmişlerdir. Galov ve ark (2005)'nin 3 farklı at ırkında 9 mikrosatellit ile yaptıkları başka bir çalışmada en yüksek ortalama Ho değeri 0.750, He değeri ise 0.756 olarak bildirilmiştir. Romanya'nın Hucul atlarında (Georgescu ve ark 2008) ise ortalama Ho değeri 0.705, He değeri 0.718 olarak gözlenmiştir. Polimorfizmin temel göstergelerinden olan PIC değeri 0.774-0.832 arasında değişmektedir ve ortalama 0.810 olarak hesaplanmıştır. Aynı değer Juras ve Cothran (2004) tarafından 0.624-0.748 olarak belirtilirken, Jakobova ve ark (2002) 0.473-0.817 olarak belirtmişlerdir. Çalışmada bazı populasyonlarda kullanılan sınırlı sayıda örnek ve lokusa rağmen, genetik çeşitliliğin ve genel populasyon parametrelerinin (Na, Ho, He ve PIC) diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bunun sebebinin kullanılan mikrosatellitlerin enformasyon gücünün yüksek oluşundan veya Türkiye'nin coğrafi konum açısından göç yolları üzerinde bulunması nedeniyle gen havuzunun geniş olmasından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

Kullanılan bütün lokuslar açısından HWE'den sapma olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada belirtilen, pozitif ve istatistiksel olarak önemli olan F_{IS} değerleri bu sonucu desteklemektedir. Bu durum özellikle Arap ve

melez at ırklarında akrabalık derecesinin yüksekliğine bağlı olarak şekillenebilir. Kelly ve ark (2002)'da yaptıkları çalışmada benzer bulgulardan bahsetmektedirler.

Populasyonlar arası farklılığın tespiti için hesaplanan F_{ST} değerleri istatistiki olarak önemli ($p < 0.001$) bulunmuştur (Tablo 3). Diğer populasyonlar birbirinden farklı görünürken sadece İngiliz ve Yarım Kan İngiliz atları arasında hesaplanan F_{ST} değerinin istatistiki olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir. Giacomoni ve ark (2008) yaptıkları çalışmada F_{ST} değerlerini 0.008-0.064 olarak belirtmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada ise (Georgescu ve ark 2008) bu değerler 0.058-0.186 olarak belirtilmiştir. Benzer şekilde gerek NJT metodu ile çizilen ağaçta ve gerekse FCA grafiğinde bu iki populasyonun birlikte kümelendiği görülmektedir. Bu populasyonların yapısı göz önüne alındığında sonucun normal ve yapılan testin güvenilir olduğu anlaşılmaktadır.

Dışlama gücü (DG) değeri hatalı ebeveynlerin ne kadar dışlandığının bir göstergesidir ve testlerin güvenilirlik derecesini tanımlamada önemlidir. Bu çalışmada 5 lokus için hesaplanan toplam DG-1 değerinin 0.9680, DG-2 değerinin ise 0.9960 olduğu (Tablo 2) gözlenmiştir. Juras ve Cothran (2004) 3 farklı at ırkında 15 mikrosatellit kullanarak yaptıkları bir çalışmada total DG değerinin, her ırk için farklı olarak 0.9991 ve 0.9999 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Benzer şekilde Tozaki ve ark (2001) 7 ve 8 mikrosatellit kullanarak toplam DG değerini yaklaşık 0.5000 olarak bulurken, 15 mikrosatellit kullanarak total DG değerini 0.9999 olarak belirlemişlerdir. Marklund ve ark (1994) 8 mikrosatellit kullanarak farklı at ırklarında yaptıkları çalışmada ise toplam DG değerini 0.9600-0.9900 arasında bulduklarını bildirmektedirler. Bu çalışmaya benzer olarak 6 mikrosatellit kullanılarak yapılan bir çalışmada (Jakabova ve ark 2002) ise toplam DG değeri 0.9980 iken, aynı çalışmada 5 mikrosatellit kullanılarak hesaplanan DG değeri 0.9840 olarak bildirilmiştir. Luis ve ark (2002) ebeveyn testi için kan grubu, protein polimorfizmi ve mikrosatellit metodunu karşılaştırmışlar ve 6 mikrosatellit kullanarak toplam DG değerini Sorraia atlarında 0.8850, Lusitano ırkında ise 0.9960 olarak bulmuşlardır.

Yukarıda verilen örneklerden de anlaşılacağı gibi, kullanılan mikrosatellit sayısı DG değerlerinin yüksek oluşunda önemli bir etkidir. Sunulan çalışmada gözlenen DG değerleri her ne kadar daha çok sayıda mikrosatellit kullanılarak yapılan çalışmalara göre düşük olsa da, benzer sayıda mikrosatellit kullanılan çalışmalara göre çok daha güvenilir sonuçlar vermesi açısından önem arz etmektedir.

► Öneriler

Sunulan çalışmada, oluşturulan test paneli hem genetik çeşitlilik, hem de dışlama gücü verilerine bakıldığında kimliklendirme çalışmaları için oldukça kullanışlı ve sağlıklı sonuçlar vermektedir. Her ne kadar

kullanılan mikrosatellitlerin enformasyon gücü yüksek olsa da akrabalık oranlarının fazla olduğu populasyonlarda daha kesin sonuçlar almak için panelde kullanılacak mikrosatellitlerin sayılarının artırılması yerinde olacaktır. Ancak yukarıda da tartışılan iş gücü, ekonomik ve teknolojik gelişmeler dikkate alındığında bu tür çalışmalar için kapillar elektroforez ve fragman analizi yönteminin kullanılması daha avantajlı görünmektedir.

► Teşekkür

Çalışmanın gerçekleşmesinde destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (2002/058) teşekkür ederiz. Çalışmanın özeti 31st FEBS Congress Molecules in Health&Disease (24-29 June 2006, İstanbul-Turkey)'de sunulmuş ve bildiri özet kitapçığında yayınlanmıştır.

► Kaynaklar

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Goudet J, Bonhomme F, 1996-2000. Genetix 4.00 Windows™ software population genetics, Laboratoire Genome, Populations, Interactions, University of Montpellier, France.
- Bowling AT, Clark RS, 1985, Blood-group and protein polymorphism gene-frequencies for 7 breeds of horses in the United-States, *Anim Blood Groups BI*, 16, 2, 93-108.
- Bowling AT, Eggleston-Stott ML, Byrns G, Clark RS, Dileanis S, Wictum E, 1997. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim Genet*, 28, 247-252.
- Bulut Z, Nizamlioglu M, Togan İ, 2004. Hasmer, Hasak ve Alman Siyah Baş koyun ırklarının genetik yapılarının mikrosatellit markerlarla incelenmesi. *Eurasian J Vet Sci*, 20, 85-91.
- DeAssis JB, DeLaat DM, Peixoto MGCD, Bergmann JAG, Fonseca CG, Carvalho MRS, 2009. Genetic diversity and population structure in Brazilian Mangalarga Marchador horses. *Genet Mol Res*, 8, 1519-1524.
- Galov A, Byrne K, Duras-Gomercic M, Gomercic T, Nushol Z, Dragutin Vincek, Kocijan I, Tadic Z, Benkovic V, Basic I, Funk SM, 2005. Effectiveness of nine polymorphic microsatellite markers in parentage testing in Posavina, Croatian Coldblood and Lipizzaner horse breeds in Croatia. *Livestock Prod Sci*, 93, 277-282.
- Georgescu SE, Manea MA, Costache M, 2008. The genetic structure of indigenous Romanian Hucul horse breed inferred from microsatellite data. *Roumanian Biotech Let*, 13, 4030-4036.
- Giacomoni EH, Fernandez-Stolz GP, Freitas TRO, 2008. Genetic diversity in the Pantaneirohorse breed assessed using microsatellite DNA markers. *Genet Mol Res*, 7, 261-270.
- Goldstein DB, Schlotterer C, 1998. *Microsatellites: Evolution and Application*, Oxford University Press, Oxford and Vienna, pp: 80-97.
- Hoffmann I, Marsan PA, Barker JSF, Cothran EG, Hanotte O, Lenstra JA, Milan D, Weigend S, Simianer H, 2004. New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: Recommendations of a joint ISAG/FAO working group. 29th ISAG (International

- Society of Animal Genetics) Congress, 11–16 September, Tokyo, 2004.
- Jakabova D, Trandzik J, Chrastina J, Hudecova L, Zetochova E, Bulla J, Bugarsky A, Jakab F, Kozlik P, 2002. Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases in thoroughbred horses in Slovakia. *Czech J Anim Sci*, 47, 497-501.
- Juras R, Cothran EG, 2004. Microsatellites in Lithuanian native horse breeds: usefulness for parentage testing. *Biologija*, 4, 6-9.
- Kelly L, Postiglioni A, De Andres DF, Vega-Pla JL, Gagliardi R, Biagetti R, Franco J, 2002. Genetic characterisation of the Uruguayan Creole horse and analysis of relationships among horse breeds. *Res Vet Sci*, 72, 69-73.
- Kiguwa SL, Hextall P, Smith AL, Critcher R, Swinburne J, Million L, Binns MM, Goodfellow PN, McCarthy LC, Farr CJ, Oakenfull EA, 2000. A horse whole-genome-radiation hybrid panel: Chromosome 1 and 10 preliminary maps. *Mamm Genome*, 11,803-805.
- Kurar E, 2001. Comparative physical and linkage mapping of bovine chromosome 24 with human chromosome 18, Thesis, University of Wisconsin-Madison, USA.
- Lindgren G, Sandberg K, Persson H, Marklund S, Breen M, Sandgren B, Carlsten J, Ellegren H, 1998. A primary male autosomal linkage map of the horse genome, *Genome Res*, 8, 951-966.
- Luis C, Cothran EG, Oom MM, 2002. Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage testing. *Genet Molec Biol*, 25, 131-134.
- Marklund S, Ellegren H, Eriksson S, Sandberg K, Andersson L, 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim Genet*, 25, 19-23.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM, 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*, 7, 639-655.
- Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York, USA, pp: 90-128
- zsensoy Y, Kurar E, Bulut Z, Nizamlilu M, 2008. Mikrosatellit DNA markörleri kullanılarak atlarda ebeveyn tayini: Bir vaka takdimi. *Eurasian J Vet Sci*, 24, 87-91.
- zsensoy Y, Kurar E, Doan M, Bulut Z, Altunok V, Iık A, amlıda A, Nizamlilu M, 2010. Türkiye’de bulunan bazı yerli sığır ırklarının STR markörler ile genetik karakterizasyonu. *BIBAD*, 3, 163-171.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition, Cold-Spring Harbor, New York, USA, Volume 2, pp: 9.16-9.19.
- Tozaki T, Kakoi H, Mashima S, Hirota K, Hasegawa T, Ishida N, Miura N, Choi-Miura NH, Tomita M, 2001. Population study and validation of paternity testing for thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J Vet Med Sci*, 63, 1191-1197.
- Tozaki T, Takezaki N, Hasegawa T, Ishida N, Kurosawa M, Tomita M, Saitou N, Mukoyama H, 2003. Microsatellite variation in Japanese and Asian horses and their phylogenetic relationship using a European horse outgroup. *J Hered*, 94, 374-380.