

A magyar hidegvérű lovak genetikai diverzitás vizsgálata

Csizmár Nikolett – Mihók Sándor – Jávör András – Kusza Szilvia

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,

Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen

csizmar@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A takarmányozási technológia újításával, a felgyorsult szállítási, valamint kommunikációs lehetőségek révén a nagy termelési kapacitású fajták világszerte felváltották, egyben a géntartalékok közé juttatták a helyi őshonos fajtákat. Ez utóbbiak jelenlegi elsődleges szerepe a génmegőrzés. Ugyanakkor ezek őrzése az állattenyésztési kultúra megbecsülése, és kétségtelenül meglévő genetikai értékük miatt kiemelten fontos. A magyar hidegvérű ló tenyészállományát illetően az alapító törzskönyv híján vagyunk, a fajta tényleges alapító kancái nem ismertek. Ezen okból kifolyólag nagy jelentőségű a meglévő állomány genetikai hátterének feltérképezése, hogy a tenyésztés a valós genetikai diverzitásra alapozhasson. Jelen tanulmányunkban 195 magyarországi hidegvérű kanca sörény mintájából dolgoztunk. Analízisünket a mitokondriális DNS D-loop régióján belül a 15531–15752 bázispárok között végeztük, amely összesen 222 bázispárt jelentett. 41 polimorfikus helyet határoztunk meg, mely 39 haplotípust eredményezett ($h=39$). Az átlagos páronkénti eltérés $k=6,825$ volt. Nagyfokú haplotípus és nukleotid diverzitás értékeket tapasztaltunk ($Hd=0,968\pm 0,003$; $\pi=0,026\pm 0,003$.) A meghatározott variábilis pozíciók alapján haplotípusainkat korábbi tanulmányok által már definiált haplocsoportokba soroltuk. A vizsgált állomány 23%-a, azaz 45 kanca az F1 haplocsoportba tartozott. Az elemzett populáció közel 97%-a besorolható volt a Jansen et al. (2002) által meghatározott 8 haplocsoport valamelyikébe. Jelen tanulmány a magyarországi állomány közel 25%-áról ad genetikai információt. További lehetőség lehetne a nagyobb mértékben mintázott állomány, illetve több genetikai marker bevonása a vizsgálatokba, hogy részletesebb és megbízhatóbb adatokkal támogathassuk a fajta tenyésztési programját.

Kulcsszavak: magyar hidegvérű, genetikai diverzitás, haplotípus, haplocsoport, mitokondriális DNS, D-loop kontroll régió

SUMMARY

Because of the feeding technology innovation, accelerated transport and communication facilities breeds of high performance breeds replaced local autochone breeds worldwide. These latter species however have an important role in gene conservation. Hungarian cold-blooded horse breeding stock are lacking pedigree, the actual founder breed mares are not known. For this reason, it is an major priority defining the genetic background of the existing flock, for that breeding could operate with purposeful using of origin maternal founders. In the present study 195 cold-blooded Hungarian mares tail and mane sample were analyzed. Our analysis was carried out between 15531–15752 base pairs in mitochronial DNA D-loop region, which reported a total of 222 base pairs. Fortyone polymorphic sites were determined, which resulted in 39 haplotypes ($h=39$). The average pairwise differences were $k=6.825$. High haplotype and nucleotide diversity values were observed ($Hd=0.968\pm 0.003$, $\pi=0.026\pm 0.003$). Based on the previously defined variable positions of haplotypes defined by Jansen et al (2002), we grouped our haplotypes into haplogroups. 23 percent of the studied population (45 mares) belonged to haplogroup F1. Nearly 97% of the analyzed population was classified into one of eight haplogroups defined by Jansen et al. (2002). This study gives genetic information nearly 25% of the Hungarian population. Another possibility would be patterning more mares or involving more genetic marker in the study which will assuming the possibility of a more comprehensive analysis.

Keywords: Hungarian draft, genetic diversity, mitochondrial DNA, D-loop control region, haplotype, haplogroup

BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben a különböző állatfajok fajtái esetében különös hangsúlyt fektettek a szelekciós programok hatékonyságának növelésére, aminek köszönhetően a korszerű molekuláris genetikai módszerek alkalmazása is egyre nagyobb teret nyert. A takarmányozási technológia újításával, a felgyorsult szállítási, valamint kommunikációs lehetőségek révén a nagy termelési képességű fajták világszerte felváltották a helyi őshonos fajtákat. Ez utóbbiak jelenlegi elsődleges szerepe a génmegőrzés. A génmegőrzés sorsára jutott fajták genetikai értéke (kitűnő másodlagos érték-mérő tulajdonságok, ritka allélek folytán számottevő diverzitás) ugyanakkor hozzájárul mind a jelenlegi, mind jövőbeni kívánatos tulajdonságok megőrzéséhez (Notter 1999, Bruford et al. 2003, Toro et al. 2009).

A gazdasági állatok genetikai erőforrásai hatékony irányításának előfeltétele, hogy átfogó ismeretekkel bírjunk a különböző fajták jellemzőiről, beleértve ter-

melési környezetüket, földrajzi előfordulásukat, a populációra vonatkozó adatokat – nagysága, szerkezete –, valamint a különböző fajtákon belüli és fajták közötti genetikai diverzitást. Általánosan elfogadott tény, hogy a fajták közötti valamint fajtákon belüli diverzitással kapcsolatos, részletes molekuláris genetikai adatok nélkülözhetetlenek gazdasági állatfajták genetikai erőforrásainak hatékony irányításához (Weitzman 1993, Hall és Bradley 1995, Barker 1999, Ruane 2000, Bruford et al. 2003, Simianer 2005, Toro és Caballero 2005, Toro et al. 2009). Az említett adatok kinyeréséhez a technológiai fejlődés ma már számos lehetőséget kínál a kutató számára. A vércsoportok, az enzim polimorfizmusok, az antigének már sikeresen alkalmazhatók, de mitokondriális DNS, továbbá Y-kromoszómális haplotípusokat, valamint mikroszatelliteket és SNP-eket (egyszerű szekvencia polimorfizmus) is elterjedten használnak.

A géntartalékok megőrzésére irányuló molekuláris genetikai vizsgálatoknál jelenleg maga a fajta jelenti az alapegységet (Groeneveld et al. 2010). Valószínűsít-

hetően a legtöbb genetikai diverzitás feltérképezésére irányuló munka fajtákon belül, nem pedig különböző fajták között valósul meg. Ez a megállapítás megegyezik Rosenberg et al. (2002) következtetésével humán viszonylatban.

A filogenetikai vizsgálatokat tekintve, emlősök esetében a mitokondriális DNS igen széles körben alkalmazott molekuláris eszköz. Vilá et al. (2001) megállapították, hogy a háziasított lovak több anyai alapítóra vezethetők vissza, s ezzel magyarázható a nagyfokú diverzitás a lovak mitokondriális DNS haplotípusaiban.

A ló teljes mitokondriális genom szekvencia 1994 óta elérhető (Xu és Arnason 1994). A genetikai markerrek alapvetően származásellenőrzésre használhatók, hogy a különböző genetikai variáció eltérő szintjei meghatározásra kerülhessenek általuk. Nagy jelentőségű, hogy így lehetőség nyílik populációk összehasonlítására és más populációkkal a rokonsági fokok felderítésére (Cothran és Van Dyk 1998, Canon et al. 2000, Bjornstad et al. 2000, Juras et al. 2003, Tozaki et al. 2003, Aberle et al. 2004). Számos tanulmány foglalkozik a mitokondriális DNS D-loop régiójával, mint a mitokondriális DNS legnagyobb variabilitással bíró részével (Ishida et al. 1994). Ez annak tulajdonítható, hogy itt a legnagyobb a szubsztitúciós ráta a mtDNS többi szakaszához viszonyítva (Cann et al. 1984). A molekuláris genetikai, valamint evolúciós tanulmányokat tekintve – lovak mitokondriális DNS vizsgálata esetében – a legtöbb esetben két hipervariábilis szegmens ~350–650 bázispár hosszú szakaszát analizálják. Ez a HVS-I: 15469–15834 nukleotid pozíció, és a HVS-II: 16351–16660 nukleotid pozíció. Mindezt a kontroll régióon belül (D-loop-15469–16660 nukleotid pozíció) (Vilá et al. 2001, Jansen et al. 2002, Cieslak et al. 2010, Gurney et al. 2010) végzik. A D-loop régió hipervariabilitásának köszönhetően kiválóan alkalmas a mtDNS az anyai vonalak feltárására és a genom evolúciójának modellezésére.

Az említett mtDNS D-loop régióját felhasználva célunk volt meghatározni a mintázott magyar kancaállomány alap genetikai diverzitás mutatóit, továbbá a különböző haplotípusok alapján a populációt korábbi tanulmányok felhasználásával haplocsoportokba rendezni.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A minták előkészítése

Annak érdekében, hogy ennek az őshonos lófajtának a genetikai forrásait megismerhessük, a mitokondriális DNS D-loop régióját használtuk a genetikai diverzitás mutatók meghatározásához. Tehettük ezt azért, mert a mitokondriális genom egyéb szakaszaihoz viszonyítottan ez a régió a legváltozatosabb rész. A minták különböző hazai tenyésztők törzskönyvi nyilvántartásban szereplő kancáitól származtak, így az egyedi azonosító alapján származásuk is nyomon követhető. Jelen vizsgálatban 195 minta képviselte a magyar kancaállományt. A gDNS izolálása sörény mintákból történt (FAO/IAEA 2004). Az labormunkálatok a Debreceni Egyetem MÉK Állatgenetikai Laboratóriumában történtek.

A protokollnak megfelelően a levágott szőrnyagymákra 100 µl Hair Buffer került kimérésre, mely az alábbiakat tartalmazta: 250 µl Tween 20; 5 ml 10 mM-os PCR reakciókhoz alkalmazott puffer, így nem tartalmazott MgCl₂-t; valamint 5 ml MgCl₂ (25 mM). A reakció katalizálása érdekében 1 µl proteinase K-t (20 mM) adtunk minden mintához. Ezt követően a mintákat előbb 60 percre 37 °C-os, majd 20 percre 80 °C-os vízfürdőbe helyeztük inkubálás céljából. A további analízis megkezdése előtt a minták koncentrációját NanoDrop® ND-1000 készülékkel ellenőriztük. A PCR reakció sikeressége érdekében mintáink koncentrációját 10 és 100 mg/l közé eső értékre hígítottuk.

PCR reakciók optimalizálása

A primertervezés során a Primer3 programot használva a mitokondriális DNS D-loop régiójába terveztünk primereket (1. ábra), melyet az optimális PCR reakció körülményeinek beállítása követett.

Fontos lépés volt a PCR kondíciók, valamint a szükséges reakcióelegy meghatározása. Az amplifikációhoz szükséges reakcióelegy összetevői a következők voltak: 1 µl genomális DNS izolátum (10–100 mg/l), 25 mM-os dNTP /Fermentas, 25 mM-os GoTaq Flexi Buffer Promega, 25 mM-os MgCl₂ Promega, Sigma forward és reverse primer egyenként 10 pmol/µl-os, dH₂O. Sikertelen PCR reakciót követően, egyszerre

1. ábra: A ló mitokondriális DNS D-loop régiójának szekvenciárszlete FASTA formátumban

```
>gi|577571|emb|X79547.1| Equus caballus mitochondrial DNA complete sequence, D-loop regio
TAACATGAATCGGCGGACAGCCAGTGGAAACCCCATACGTAATTATCGGCCAACTGGCCCTCAATCCTACTTCTCCTAATTCTCATTTTATACCACCTCGAAGCACCATCGA
AAACAATCTCTAAAATGAAGAGTCCCTGTAGTATATCGCACATTACCTGGTCTGTAAACAGAAAAGGGGAAAACGTTTCTCCCAAGGACTATCAAGGAAGAAGCTCTA
GCTCCACCATCAACACCCAAAGCTGAAATTCTACTTAACTATTCTTTGATTTCTTCCCTAAACGACAACAATTTACCCTCATGTGCTATGTCAGTATCAGATTATACCCACAT
AACACCATACCACCTGACATGCAATATCTTATGAATGGCCTATGTACGTGTCATTAAATTGTCTGCCCATGAATAAAGCATGTACATAATATCATTTATCTTACATAAGT
ACATTATATTATTGATCGTGCATACCCCATCCAAGTCAAATCATTTCCAGTCAACACGCATATCACAGCCCATGTTCCACGAGCTTAATCACCAAGCCCGGGAAATCAGCAACC
CTCCCAACTACGTGTCCTCAATCCTCGCTCCGGGCCATCCAACGTGGGGTTTCTACAATGAACTATACCTGGCATCTGGTCTTTCTTCAGGGCCATTCCACCCAACCTCGC
CCATTCTTTCCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCATGCTCACACATACTGTGATTTTCATGATTTGGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACT
CAGTATGGCCGTCAAAGGCCTCGACGAGTCAATTAATTGAAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCTCCGCATCAGCAACCATAAAGGTGTTATTCAGTCCATGGTAGCCG
GACATAGGAAACAAGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGC
ACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCAC
TGTGCACCTGTGCACCTACCCGCGCAGTAAGCAAGTAATATAGCTTTCTTAAATCAAACCCCTACCCCTTAAACTCCACATATGTACATTCAACACAATCTGCCAAACCC
CAAAAACAAGACTAAACAATGCACAATACTTATGAACTTAACTCGCATGCAACCATAAACTCAACACACCTAAACAATCTTAACAGAACTTTCCCCCGCCATTAATAC
CAACATGCTACTTTAATCAATAAAATTTCCATAGACAGGCATCCCTCCCTAGATCTAAATTTCTAAATCTGTCAACCCCTTCTCCCTC
```

Megjegyzés: a szürke háttérben megjelenő szekvencia részletek az alkalmazott primerpárokat jelölik, melyek azonosak a referencia szekvencia megfelelő részleteivel. Vizsgálataink során az aláhúzással jelölt szekvencia szakaszt használtuk.

Figure 1: The sequence detail of the D-loop region of the horse mtDNA in FASTA form

Note: sequence information on the gray background indicate the used primer pairs which are the same as corresponding details on the reference sequence. In our study we used the sequence underlined section.

maximum két komponensen és/vagy kondícióon változtattunk. A PCR reakciók kiinduló kondíció beállításai az 1. táblázatban szerepelnek.

1. táblázat

| PCR reakció kondíciói | | | |
|---------------------------|-------|--------|--------------|
| Kezdő denaturáció(1) | 95 °C | 10 min | |
| Denaturáció(2) | 95 °C | 20 sec | |
| Primerrek kapcsolódása(3) | 62 °C | 30 sec | 35 ciklus(6) |
| Elongáció(4) | 70 °C | 30 sec | |
| Záró szakasz(5) | 72 °C | 10 min | |
| | 10 °C | ∞ | |

Table 1: PCR conditions

Initial denaturation(1), Denaturation(2), Annealing(3), Extension(4), Final extension(5), 35 cycle(6)

Mivel a primerrek betapadása a megfelelő helyre a feltapadási hőmérséklet függvényében változik, így ezt a hőmérsékletet vizsgálatainkat megelőzően, korábban gradiens PCR-el meghatároztuk. A PCR reakciók sikerességét (primer megfelelő helyre való feltapadása, melléktermék mennyisége) 2%-os agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük, melyet a következő összetevők alapján korábban elkészítettünk: 2% Seakemagarose, 1x TAE (Tris-acid-EDTA) puffer, majd az így kapott elegyhez GelRed (Biotium, USA) DNS festéket adtunk. PCR termékeinkből mintánként 3 µl-t vittünk fel az agaróz géltre, majd 100 V feszültségen addig futattuk – TAE puffer közegben –, míg a jelölőfesték el nem érte a gél alsó részét. A PCR termék tisztítását a Viogene DNA/RNA Extraction (PCR-M Clean up System) kit-tel végeztük, a gyártó utasításai alapján.

Adatok értékelése

Előkészített mintáinkat a Macrogen Company (Hollandia, Amszterdam) cég részére küldtük el, mely cég segítségével történt azok szekvenálása. Analízisünket a mitokondriális DNS D-loop régióján belül a 15531–15752 bázispárok között végeztük, mely összesen 222 bázispárt jelentett. A nukleotid bázisok helyes olvasását, valamint a szekvenciák illesztését a Codon-CodeAligner V.6.0.2. program segítségével végeztük. A statisztikai értékelés a Mega szoftvercsomag két verziójával történt: Mega6 (Tamura et al. 2013), és Mega7.0 (Kumar et al. 2016). A haplotípusok számát, a haplotípus és nukleotid diverzitást és a különböző diverzitás mutatókat a DnaSP5 (Librado és Rozas 2009) 1. és a Mega6 programokkal számoltuk (Tamura et al. 2013). A haplocsoportok egymáshoz viszonyított távolságértékei alapján készült Maximum Likelihood fa a Mega7 (Kumar et al. 2016) programmal készült.

EREDMÉNYEK

Vizsgálataink során százkilencvenöt 222 bázispár hosszú a mitokondriális DNS D-loop régióján belüli szekvencia analízisét végeztük el. 41 polimorfikus helyet határoztunk meg, amely 39 haplotípust eredményezett ($h=39$). A 39 haplotípust tekintve 18 olyat detektáltunk, mely mindössze egyetlen egyeddel képviseltette magát. Ezek a következők voltak: 1-es, 2-es,

4-es, 5-ös, 7-es, 11-es, 13-as, 16-os, 19-es, 21-es, 23-as, 25-ös, 27-es, 28-as, 29-es, 31-es, 32-es, valamint a 37-es haplotípusok. Mindebből következtethetünk a fajtában fellelhető igen nagyfokú diverzitás mértékére. A legnagyobb egyedszámmal a 34-es haplotípus rendelkezett, 30 kancával. Az átlagos páronkénti eltérés $k=6,825$ volt. Nagyfokú haplotípus és nukleotid diverzitás értékeket tapasztaltunk ($Hd=0,968\pm 0,003$; $\pi=0,026\pm 0,003$), mely számszerint többnek bizonyult, mint Moridi et al. (2012) által, az iráni lovaknál tapasztalt érték; ugyanakkor hasonlóak Pérez-Gutiérrez et al. (2008) és Zhang et al. (2012) eredményeihez, amelyek 0,975 és 0,977 értéket vettek fel. Kapott haplotípusainkat összevetettük a Hill et al. (2002) által is használt Génbankban elérhető *Equus caballus* referencia szekvenciával. Meghatároztuk a variábilis pozíciókat a már korábban említett 15531–15752 bp szekvencia részleten (2. ábra).

A meghatározott variábilis pozíciók alapján a kapott haplotípusokat a Jansen et al. (2002) által korábban definiált haplocsoportokba soroltuk. A MEGA7.0 programcsomag segítségével teszteltük a különböző szubsztitúciós modelleket. Ez a teszt a Tamura 3-parameter (Tamura 1992) + G modellt javasolta az adott szekvenciák esetében. Az evolúciós ráták haplotípusok közötti különbségek felderítéséhez diszkrét Gamma eloszlást használtunk. 1000 ismétléses bootstrap fát használva az adott taxon elemzésével képet kaptunk egyedek evolúciós hátteréről (Felsenstein 1985).

A vizsgált állomány 23%-a, azaz 45 kanca az F1 haplocsoportba tartozott. Igen gyakori haplocsoportnak bizonyult a D2, mely 42 egyedet és 6 haplotípust foglalt magában. Az elemzett populáció közel 97%-a besorolható volt a Jansen et al. (2002) által meghatározott 8 haplocsoport valamelyikébe, annak ellenére, hogy ő összesen 17 csoportot definiált. Legritkább haplocsoportunk az A6, illetve a C2 volt, amelyek mindössze egyetlen egyeddel képviseltették magukat. Két haplotípus 4 kancával a G haplocsoportba tartozó variábilis helyeket mutatott, amely meglehetősen ritka. McGahern et al. (2006) legtöbb fajtát összehasonlító kutatásában mindössze egy archaikus, 25 európai, két közel- és két távolkeleti ló tartalmazott G haplocsoportba sorolható szekvenciát (3. ábra).

KÖVETKEZTETÉSEK

Össességében elmondható, hogy a magyar hidegvérű fajta jelenleg hozzávetőlegesen 800 kancát számláló állománya túlélését a tenyésztési programoknak köszönheti. Ennek következtében az állományban fellelhető különböző haplotípusok gyakorisága attól függ, hogy a különböző kancák milyen mértékben kerülnek bevonásra a tenyésztésbe. Fontos tehát feltérképeznünk a mintázható állomány genetikai hátterét, hisz nem tudhatjuk, mely kancák hordozzák az eredeti alapítók genetikai jegyeit. Jelen tanulmány a magyarországi állomány közel 25%-áról ad genetikai információkat. 41 polimorf helyet határoztunk meg, amely 39 haplotípust eredményezett. 18 olyat detektáltunk, mely mindössze egyetlen egyeddel képviseltette magát.

Ennek köszönhetően, valamint a nagyfokú haplotípus és nukleotid diverzitás értékekből adódóan elmondhatjuk, hogy jelen vizsgált fajta igen nagymérté-

kü genetikai diverzitással bír. Mindazonáltal elmondható, hogy ez a vizsgálat csupán kiinduló pontja volt egy teljes, átfogó genetikai analízisnek.

IRODALOM

- Aberle, K. S.–Hamann, H.–Drogemüller, C.–Distl, O. (2004): Genetic diversity in German draught horse breeds compared with the group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. *Animal Genetics*. 35. 4: 270–277.
- Barker, J. S. F. (1999): Conservation of livestock breed diversity. *Animal Genetic Resources Information*. 25: 33–43.
- Bjornstad, G.–Gunby, E.–Roed, K. H. (2000): Genetic structure of Norwegian horse breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 117. 5: 307–317.
- Bruford, M. W.–Bradley, D. G.–Luikart, G. (2003): DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*. 4. 11: 900–910.
- Cann, P. L.–Brown, W. M.–Wilson, A. C. (1984): Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics*. 106: 479–499.
- Cañon, J.–Checa, M. I.–Carlos, C.–Vega-Pla, J. L.–Dunner, S. (2000): The genetic structure of Spanish horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics*. 31. 1: 39–48.
- Cieslak, M.–Cieslak, M.–Pruvost, M.–Benecke, N.–Hofreiter, M.–Morales, A.–Reissmann, M.–Ludwig, A. (2010): Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses. *PLoS One*. 5: e15311.
- Cothran, E. G.–Van Dyk, E. (1998): Genetic analysis of three South African horse breeds. *Journal of the South African Veterinary Association*. 69: 120–125.
- FAO/IAEA (2004): Agriculture Biotechnology Laboratory, Handbook of Laboratory Exercises. IAEA Laboratories. Seibersdorf. Austria.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783–791.
- Groeneveld, L. F.–Lenstra, J. A.–Eding, H.–Toro, M. A.–Scherf, B.–Pilling, D.–Negrini, R.–Finlay, E. K.–Jianlin, H.–Groeneveld, E.–Weigend, S.–The GLOBALDIV Consortium (2010): Genetic diversity in farm animals – a review. *Animal Genetics, Immunogenetics, Molecular Genetics and Functional Genomics*. 41. Suppl. 1: 6–31.
- Gurney, S. M.–Schneider, S.–Pflugradt, R.–Barrett, E.–Forster, A. C.–Brinkmann, B.–Jansen, T.–Forster, P. (2010): Developing equine mtDNA profiling for forensic application. *International Journal of Legal Medicine*. 124. 2: 617–622.
- Hall, S. J. G.–Bradley, D. G. (1995): Conserving livestock breed diversity. *Trends in Ecology and Evolution*. 10: 267–270.
- Hill, E. W.–Bradley, D. G.–Al-Barody, M.–Ertugrul, O.–Splan, R. K.–Zakharov, I.–Cunningham, E. P. (2002): History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*. 33: 287–294.
- Ishida, N.–Hasegawa, T.–Takeda, K.–Sakagami, M.–Onishi, A.–Inumaru, S. (1994): Polymorphic sequence in the D-loop region of the equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics*. 25: 215–221.
- Jansen, T.–Forster, P.–Marsha, A. L.–Hardy, O.–Hurles, M.–Renfrew, C.–Weber, J.–Olek, K. (2002): Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99: 10905–10910.
- Juras, R.–Cothran, G. E.–Klimas, R. (2003): Genetic analysis of three Lithuanian native horse breeds. *Acta Agriculturae Scandinavica. Sec A. Animal Science*. 53. 4: 180–185.
- Kumar, S.–Stecher, G.–Tamura, K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. (in press)
- Librado, P.–Rozas, J. (2009): DnaSP v 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25. 11: 1451–1452.
- McGahern, A.–Bower, M. A.–Edwards, C. J.–Brophy, P. O.–Sulimova, G.–Zakharov, I.–Vizuete-Forster, M.–Levine, M.–Li, S.–MacHugh, D. E.–Hill, E. W. (2006): Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA sequences in Eastern horse populations. *Animal Genetics*. 37. 5: 494–497.
- Moridi, M.–Masoudi, A. A.–Vaez Torshizi, R.–Hill, E. W. (2012): Mitochondrial DNA D-loop sequence variation in maternal lineages of Iranian native horses. *Animal Genetics*. 44. 2: 209–213.
- Notter, D. (1999): The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *Journal of Animal Science*. 77. 1: 61–69.
- Pérez-Gutiérrez, L. M.–De la Peña, A.–Arana, P. (2008): Genetic analysis of the Hispano-Breton heavy horse. *Animal Genetics*. 39. 5: 506–514.
- Rosenberg, N. A.–Pritchard, J. K.–Weber, J. L.–Cann, H. M.–Kidd, K. K.–Zhivotovsky, L. A.–Feldman, M. W. (2002): Genetic structure of human populations. *Science*. 298. 5602: 2381–2385.
- Ruane, J. (2000): A framework for prioritizing domestic animal breeds for conservation purposes at the national level: a Norwegian case study. *Conservation Biology*. 14. 5: 1385–1393.
- Simianer, H. (2005): Decision making in livestock conservation. *Ecological Economics*. 53: 559–572.
- Tamura, K. (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition–transversion and G + C–content biases. *Molecular Biology and Evolution*. 9. 4: 678–687.
- Tamura, K.–Stecher, G.–Peterson, D.–Filipski, A.–Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30. 12: 2725–2729.
- Toro, M.–Caballero, A. (2005): Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 360. 1459: 1367–1378.
- Toro, M.–Fernández, J.–Caballero, A. (2009): Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science*. 120. 3: 174–195.
- Tozaki, T.–Takezaki, N.–Hasegawa, T.–Ishida, N.–Kurosawa, M.–Tomita, M. (2003): Microsatellite variation in Japanese and Asian horses and their phylogenetic relationship using a European horse outgroup. *Journal of Heredity*. 94. 5: 374–380.
- Vilá, C.–Leonard, J. A.–Götherström, A.–Marklund, S.–Sandberg, K.–Lidén, K.–Wayne, R. K.–Ellegren, H. (2001): Widespread origins of domestic horse lineages. *Science*. 291. 5503: 474–477.
- Weitzman, M. L. (1993): What to preserve? An application of diversity theory to crane conservation. *Quarterly Journal of Economy*. 108. 1: 157–183.



Xu, X.–Arnason, U. (1994): The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: Extensive heteroplasmy of the control region. *Genetics*. 148. 2: 357–362.

Zhang, T.–Lu, H.–Chen, C.–Jiang, H.–Wu, S. (2012): Genetic Diversity of mtDNA D–loop and Maternal Origin of three Chinese Native Horse Breeds. *Asian–Australasian Journal of Animal Science*. 25. 7: 921–926.

