

Молекулярная генетика

Рубрика

doi: 10.31043/2410-2733-2018-4-3-9
УДК 575.18

С. Н. Петров, В. Р. Харзинова, О. В. Костюнина, А. В. Доцев, Н. А. Зиновьева

Разработка универсальной тест-системы для определения пола у видов семейства полорогих на основе анализа полиморфизма гена амелогенина

Аннотация. Одним из важных аспектов изучения популяционной и эволюционной генетики животных является определение их половой принадлежности с помощью ДНК маркеров. В качестве локуса-кандидата для определения пола как у диких, так и домашних видов животных используется ген амелогенина, так как варианты данного гена, расположенные на X- и Y-хромосомах, являются полиморфными по длине последовательности.

Целью наших исследований явилась разработка универсальной тест-системы для определения пола у особей семейства полорогих на основании определения полиморфизма гена амелогенина. Выборка включала 139 индивидуальных образцов домашних и диких видов животных, относящихся к 8 различным родам семейства Bovidae, в том числе Bos (n=4), Bison (n=16), Ovis (n=38), Capra (n=65), Rupicapra (n=10), Tragelaphus (n=2), Pseudois (n=2) и Hemitragus (n=2). В качестве биологического материала были использованы образцы тканей животных, полученные от сельскохозяйственных предприятий, клуба горных охотников, заповедников и зоопарков. Основой для разработки тест-системы послужили литературные источники, рекомендации международного общества генетики животных (ISAG) по маркерам для определения пола, а также последовательности гена амелогенина, депонированные в генном банке NCBI. Для амплификации фрагмента гена амелогенина были выбраны праймеры SE47 (forward: 5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3') и SE48 (reverse: 5'-CCCGCTTGGCTTGCTGTTC-3'), фланкирующие участок со специфической для Y-хромосомы делецией. При разработке тест-системы учитывали возможности визуальной детекции ампликонов посредством гель-электрофореза в агарозном геле, а также лазерной детекции посредством капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе ABI3130xl («Applied Biosystems», США). В результате выявлены различия в длинах фрагментов для X- и Y-хромосом у самцов и самок всех исследованных видов, визуально определяемые при гель-электрофорезе. Длины фрагментов, специфических для X-хромосомы, в зависимости от вида животных, составили 264 или 280 п.о., для Y-хромосомы — 202 или 217 п.о. Использование генетического анализатора ABI3130xl позволило осуществлять автоматическую лазерную детекцию полученных ампликонов, что делает возможным интеграцию разработанной тест-системы в мультиплексные системы анализа микросателлитов.

Ключевые слова: роды и виды семейства Bovidae, определение пола, амелогенин.

Авторы:

С. Н. Петров — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник; e-mail: citelekle@gmail.com;

В. Р. Харзинова — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; e-mail: veronika0784@mail.ru;

О. В. Костюнина — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярных основ селекции; e-mail: kostolan@mail.ru;

А. В. Доцев — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; e-mail: asnd@mail.ru;

Н. А. Зиновьева — доктор биологических наук, профессор, академик РАН, директор; e-mail: zinovieva@mail.ru.

Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, 142132, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

Введение. Исследование аллелофондов диких видов полорогих является одной из актуальных задач исследований популяционной и эволюционной генетики. Принимая во внимание сложности с получением проб биоматериала от диких животных, в качестве исходного материала для иссле-

дований находят применение неинвазивные пробы (волосы, пробы кала), которые могут быть найдены в местах обитания изучаемых видов животных. Учитывая различия в этиологии самцов и самок у большинства видов животных, для более объективной интерпретации результатов молекулярно-генетических исследований диких животных необходимо определение половой принадлежности исследуемых образцов. Потенциальным ДНК-маркером для определения пола животных является ген амелогенина. Амелогенин является белковым компонентом развивающейся эмалевой матрицы зубов [1]. В геноме человека выявлено наличие двух вариантов гена амелогенина (*AMEL*), один из которых локализован на X-хромосоме, а другой — на Y-хромосоме [2]. Структура гена амелогенина исследована у человека [3], крупного рогатого скота [4], овец и оленей [5], коз [6] и др. Ген амелогенина достаточно известен в сфере животноводческой науки и может применяться для идентификации пола у различных видов сельскохозяйственных животных [7, 8].

Между X- и Y-специфическими вариантами гена *AMEL* у разных видов животных наблюдается полиморфизм по длине последовательности, поэтому X- и Y-гомологи гена амелогенина могут быть пригодны для определения пола на молекулярно-генетическом уровне. Проведение ПЦР с использованием одной пары праймеров позволяет выявлять мужские и женские специфические продукты амплификации разного размера (*AMELX* и *AMELY*). Ряд авторов предлагают определение пола с использованием в качестве биоматериала не только классически используемых источников (ушной выщип, кровь, мышечная ткань), но и эмбрионов и помета животных [6, 9, 10, 11, 12]. Вместе с тем, следует отметить, что для ряда видов животных надежные тест-системы для определения пола молекулярно-генетическими методами в настоящее время отсутствуют.

Цель и методика исследований. Целью наших исследований явилась разработка универсальной тест-системы для определения пола у различных видов семейства полорогих на основании определения полиморфизма гена амелогенина.

Исследования проводили на особях семейства полорогих (*Bovidae*) разных видов и подвидов. Образцы ткани исследуемых животных были получены от сельскохозяйственных предприятий, клуба горных охотников, заповедников и зоопарков. Выборка включала 139 индивидуальных образцов домашних и диких видов животных, относящихся к 8 различным родам семейства *Bovidae*, в том числе *Bos* (n=4), *Bison* (n=16), *Ovis* (n=38), *Capra* (n=65), *Rupicapra* (n=10), *Tragelaphus* (n=2),

Pseudois (n=2) и *Hemitragus* (n=2). Данные об исследованной выборке представлены в таблице 1.

В качестве биологического материала использовали образцы тканей (ушной выщип, мышечная ткань). Выделение ДНК осуществляли с помощью колонок Nexttec («Nexttec™ Biotechnologie GmbH», Германия) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя.

Для амплификации фрагмента гена амелогенина были использованы праймеры SE47 (forward: 5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3') и SE48 (reverse: 5'-CCCGCTTGGCTTGTCTGTTGC-3'), фланкирующие участок со специфической для Y-хромосомы делецией. При разработке тест-системы учитывали возможности визуальной детекции ампликонов посредством гель-электрофореза в агарозном геле, а также лазерной детекции посредством капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе ABI3130xl («Applied Biosystems», США). ПЦР проводили в конечном объеме 15 мкл. В пробирку вносили по 14 мкл реакционной смеси, состоящей из 1,5 мкл 10x ПЦР-буфера, 1,5 мкл 2 mM раствора dNTPs, 0,2 мкл 10 mM смеси праймеров, 0,15 мкл (1 UE) Taq-полимеразы («Диалат Лтд.», Россия), 10,45 мкл бидистиллированной воды, и добавляли 1 мкл (50–100 нг) исследуемой геномной ДНК. Состав ПЦР-буфера: 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67,7 mM Трис-НС1 (pH = 8,8), 0,1 объема Tween 20. Амплификацию осуществляли на термоциклере Labcycler (SensoQuest, GmbH). После начальной денатурации (95°C, 7 мин) выполняли 40 циклов амплификации (95°C, 1 мин; 58°C, 1 мин; 72°C, 1 мин). Режим отжига рассчитывали с учетом температуры плавления праймеров. Продукты проведенной реакции визуально детектировали при гель-электрофорезе в 2% агарозном геле. Для лазерной детекции продуктов ПЦР на генетическом анализаторе ABI3130xl («Applied Biosystems», США) в праймер SE47 в 3' позиции вводили флуоресцентную метку NED. Размеры фрагментов определяли с помощью программного обеспечения Gene Mapper v. 4 («Applied Biosystems», США).

Результаты исследований. Основой для разработки тест-системы послужили литературные источники, рекомендации международного общества генетики животных (ISAG) по маркерам для определения пола [13, 14], а также последовательности гена амелогенина, депонируемые в генном банке (www.ncbi.nlm.nih.gov). Теоретически ожидаемые длины фрагментов гена амелогенина, специфические для X- (*AMELX*) и Y-хромосом (*AMELY*), для исследованных видов животных представлены в таблице 2.

Таблица 1. Характеристика исследованной выборки животных

Вид	Подвид / порода	n
Крупный рогатый скот (<i>Bos taurus</i>)	Домашняя корова (<i>B. t. taurus</i>) / холмогорская порода	4
Зубр (<i>Bison bonasus</i>)		8
Бизон (<i>Bison bison</i>)		8
Домашняя овца (<i>Ovis aries</i>)	Романовская порода	8
Снежный баран (<i>Ovis nivicola</i>)	Якутский снежный баран (<i>O. n. lydekkeri</i>)	8
Муфлон (<i>Ovis orientalis</i>)	Европейский муфлон (<i>O. o. musimon</i>)	8
Архар (<i>Ovis ammon</i>)	Алтайский архар (<i>O. a. ammon</i>)	8
	Памирский архар (<i>O. a. polii</i>)	1
	Тяньшаньский архар (<i>O. a. karelini</i>)	1
Уриал (<i>Ovis vignei</i>)	Белуджистанский уриал (<i>O. v. blanfordi</i>)	2
	Бухарский уриал (<i>O. v. bocharensis</i>)	1
	Афганский уриал (<i>O. v. cycloceros</i>)	1
Коза (<i>Capra hircus</i>)	Домашняя коза (<i>C. h. hircus</i>) / оренбургская порода	8
	Критский горный козел (<i>C. h. cretica</i>)	1
Тур (<i>Capra caucasica</i>)	Среднекавказский тур (Переходная форма <i>C. c. cylindricornis</i> и <i>C. c. severtzovi</i>)	13
	Дагестанский тур (<i>C. c. cylindricornis</i>)	12
	Кубанский тур (<i>C. c. severtzovi</i>)	13
Сибирский горный козел (<i>Capra sibirica</i>)	Среднеазиатский горный козел (<i>C. s. alaiana</i>)	5
	Гобийский горный козел (<i>C. s. hagenbecki</i>)	1
	Алтайский горный козел (<i>C. s. sibirica</i>)	6
	Гималайский горный козел (<i>C. s. sakeen</i>)	1
Безоаровый козел (<i>Capra aegagrus</i>)	Белуджистанский безоаровый козел (<i>C. a. blythi</i>)	3
Винторогий горный козел (<i>Capra falconeri</i>)	Гилгитский винторогий козел (<i>C. f. falconeri</i>)	1
	Сулейманов винторогий козел (<i>C. f. jerdoni</i>)	1
Серна (<i>Rupicapra rupicapra</i>)	Кавказская серна (<i>R. r. caucasica</i>)	9
	Шартрезская серна (<i>R. r. cartusiana</i>)	1
Горная ньяла (<i>Tragelaphus buxtoni</i>)		1
Бушбок (<i>Tragelaphus scriptus</i>)	Бушбок Менелика (<i>T. s. meneliki</i>)	1
Голубой баран (<i>Pseudois nayaur</i>)	Тибетский голубой баран (<i>P. n. nayaur</i>)	2
Тар (<i>Hemitragus</i>)	Гималайский тар (<i>Hemitragus jemlahicus</i>)	2

Результаты гель-электрофореза продуктов ПЦР показали различия в длинах фрагментов AMELY и AMELX у самок и самцов разных видов и подвидов исследуемых животных и их соответствие теоретически ожидаемым: длины фрагментов, специфических для X-хромосомы, в зависимости от вида животных, составили 264 или 280 п.о., для Y-хромосомы — 202 или 217 п.о. (рис. 1).

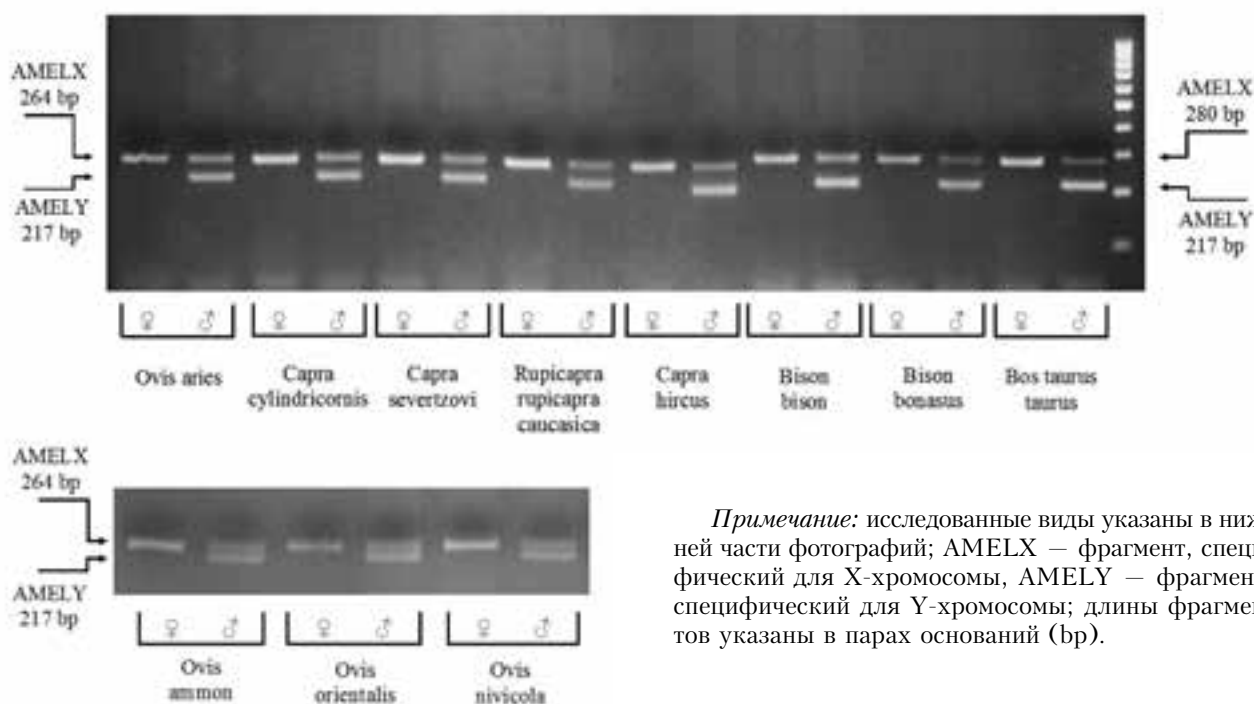
Результаты капиллярного электрофореза с последующей лазерной детекцией продуктов ПЦР, флуоресцентно меченных NED с помощью праймера SE47, на генетическом анализаторе ABI3130xl («Applied Biosystems», США) показаны на рисунке 2. Как следует из данных, представленных на рисунке 2, введение флуоресцентной метки поз-

воляет осуществлять диагностику пола животных в автоматическом режиме, а также в последующем интегрировать разработанную тест-систему в мультиплексные системы анализа микросателлитов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что разработанная нами тест-система для определения пола у животных семейства полорогих на основе гена амелогенина с использованием праймеров SE47 (forward: 5'-CAGCCA-AACCTCCCTCTGC-3') и SE48 (reverse: 5'-CCC-GCTTGGCTTGTCTGTTGC-3') при условии проведения ПЦР с указанным нами рабочим режимом температуры и экспозиции этапов реакции эффективна и достоверна, и позволяет применять её для детекции пола у исследованных таксонов.

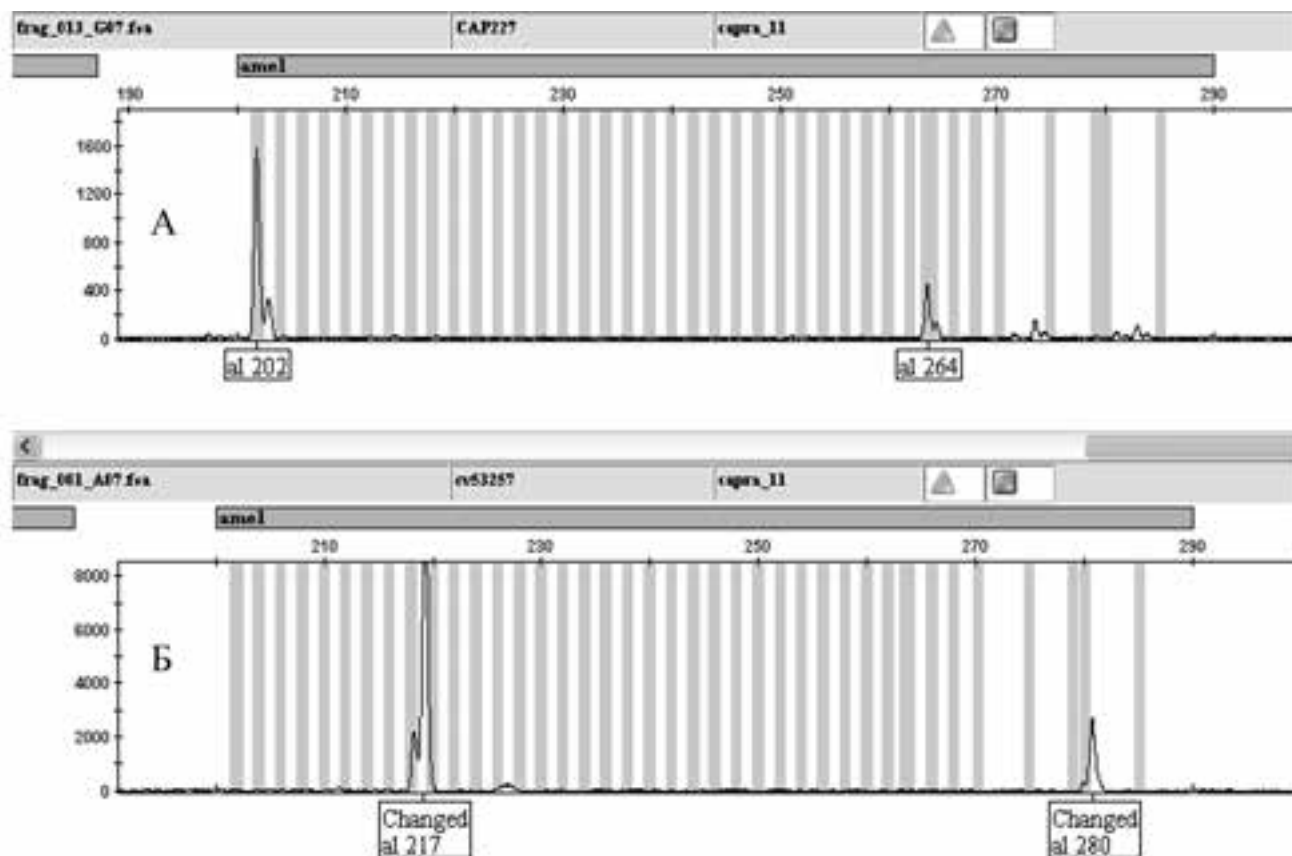
Таблица 2. Длины фрагментов, специфических для Y- и X-вариантов гена амелогенина разных видов животных

Вид (подвид, популяция)	Длина фрагмента	
	AMELY	AMELX
Домашняя корова (<i>Bos taurus taurus</i>) Зубр (<i>Bison bonasus</i>) Бизон (<i>Bison bison</i>) Горная ньяла (<i>Tragelaphus buxtoni</i>) Бушбок Менелика (<i>Tragelaphus scriptus meneliki</i>)	217	280
Домашняя коза (<i>Capra hircus</i>) Критский горный козел (<i>Capra hircus cretica</i>) Белуджистанский безоаровый козел (<i>Capra aegagrus blythi</i>)	202	264
Кавказская серна (<i>Rupicapra rupicapra caucasica</i>) Шартрезская серна (<i>Rupicapra rupicapra cartusiana</i>) Среднекавказский тур (<i>Capra caucasica</i>) Дагестанский тур (<i>Capra cylindricornis</i>) Домашняя овца (<i>Ovis aries</i>) Снежный баран (<i>Ovis nivicola</i>) Европейский муфлон (<i>Ovis orientalis musimon</i>) Архар (<i>Ovis ammon</i>) Памирский архар (<i>Ovis ammon poli</i>) Тяньшаньский архар (<i>Ovis ammon karelini</i>) Белуджистанский уриал (<i>Ovis orientalis blanfordi</i>) Бухарский Уриал (<i>Ovis vignei bochariensis</i>) Афганский уриал (<i>Ovis vignei cycloceros</i>) Гилгитский винторогий козел (<i>Capra falconeri falconeri</i>) Сулейманов винторогий козел (<i>Capra falconeri jerdoni</i>) Среднеазиатский горный козел (<i>Capra sibirica alaiana</i>) Гобийский горный козерог (<i>Capra sibirica hagenbecki</i>) Алтайский горный козел (<i>Capra sibirica sibirica</i>) Гималайский горный козел (<i>Capra sibirica sakeen</i>) Кубанский тур (<i>Capra caucasica severtzovi</i>) Тибетский голубой баран (<i>Pseudois nayaur nayaur</i>) Гималайский тар (<i>Hemitragus jemlahicus</i>)	217	264



Примечание: исследованные виды указаны в нижней части фотографий; AMELX — фрагмент, специфический для X-хромосомы, AMELY — фрагмент, специфический для Y-хромосомы; длины фрагментов указаны в парах оснований (bp).

Рис. 1. Гель электрофорез продуктов ПЦР фрагмента гена AMEL у различных видов животных, полученных с использованием разработанной тест-системы



Примечание: А — домашняя коза (*Capra hircus*); Б — домашняя корова (*B. taurus taurus*).

Рис. 2. Результаты капиллярного электрофореза флуоресцентно меченных продуктов ПЦР фрагмента гена *AMEL* у различных видов животных, полученных с использованием разработанной тест-системы

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания
№ АААА-А18-118021590138-1 в 2018 году

Литература

1. Lau E. C. Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes / E. C. Lau, T. K. Mohandas, L. J. Shapiro, H. C. Slavkin, M. L. Snead // *Genomics*. — 1989. — № 4. — P. 162–168.
2. Sasaki S. The amelogenin gene / S. Sasaki, H. Shimokawa // *Int. J. Dev. Biol.* — 1995. — № 39. — P. 127–133.
3. Nakahori Y. Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer / Y. Nakahori, K. Hamano, M. Iwaya, Y. Nakagome // *Am. J. Hum. Genet.* — 1991. — № 39. — P. 472–473.
4. Gibson C. W. Bovine amelogenin message heterogeneity: Alternative splicing and Y-chromosomal gene transcription / C. W. Gibson, E. Golub, W. R. Abrams, G. Shen, W. Ding, J. Rosenblom // *Biochemistry*. — 1992. — № 31. — P. 8384–8388.
5. Pfeiffer I. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*) / I. Pfeiffer, B. Brenig // *BMC Genetics*. — 2005. — № 6. — 16 p.
6. Chen A. Q. Sexing Goat Embryos by PCR Amplification of X- and Y- chromosome Specific Sequence of the Amelogenin Gene / A. Q. Chen, Z. R. Xu, S. D. Yu Asian-Aust // *J. Anim. Sci.* — 2007. — № 20(11). — P. 1689–1693.
7. Weikard R. Amelogenin cross-amplification in the family bovidae and its application for sex determination, molecular reproduction and development / R. Weikard, C. Pitra, C. Kühn // *Mol. Reprod. Dev.* — 2006. — № 73. — P. 1333–1337.
8. Pajares G. A sexing protocol for wild ruminants based on PCR amplification of amelogenin gene *AMELX* and *AMELY* / G. Pajares, I. Alvarez, I. Fernandez, L. Perez-Paravol, F. Goyache, L. I. Royo // *Arch. Tierz. Dummerstorf*. — 2007. — № 50(5). — P. 442–446.

9. Ennis S. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus / S. Ennis, T. F. Gallagher // *Anim. Genet.* — 1994. — № 25. — P. 425–427.
10. Malik H. N. A single blastomere sexing of caprine embryos by simultaneous amplification of sex chromosome-specific sequence of SRY and amelogenin genes / H. N. Malik, D. K. Singhal, A. Mukherjee, N. Bara, S. Kumar, S. Saugandhika, A. K. Mohanty, J. K. Kaushik, S. Bag, B. C. Das, S. K. Bhanja, D. Malakar // *Livestock Science.* — 2013. — № 157. — P. 351–357.
11. Yamauchi K. Sex determination based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in sika deer (*Cervus Nippon*) / K. Yamauchi, S. I. Hamasaki, K. Miyazaki, T. Kikusui, Y. Takeuchi, Y. Mori // *J. Vet. Med. Sci. SO.* — 2000. — P. 669–671.
12. Yamamoto K. Sex identification of Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*, by PCR based on amelogenin gene / K. Yamamoto, T. Tsubota, T. Komatsu, A. Katayama, T. Murase, I. Kita, T. Ku-do // *Theriogenology.* — 2002. — № 64. — P. 505–508.
13. Pidancier N. Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia, Artiodactyla): discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies / N. Pidancier, S. Jordan, G. Luikart, P. Taberlet // *Mol. Phylogenet. Evol.* — 2006. — № 40(3). — P. 739–449.
14. Kim B. J. Species and sex identification of the Korean goral (*Nemorhaedus caudatus*) by molecular analysis of non-invasive samples / B. J. Kim, Y. S. Lee, J. H. An, H. C. Park., H. Okumura, H. Lee, M. S. Min // *Mol. Cells.* — 2008. — № 26(3). — P. 314–8.

Petrov S., Kharzinova V., Kostyunina O., Dotsev A., Zinovieva N.

Development of a universal test for sex determination in species of the bovidae family based on the analysis of amelogenin gene polymorphism

Abstract. One of the important aspects of the population and evolutionary genetics study of animals is their sex determination using DNA markers. As a candidate locus for sex determination in both wild and domestic animal species is the amelogenin gene, since the variants of this gene located on the X and Y chromosomes are polymorphic along the sequence. The aim of our research was the development of the universal test system for sex determination in species of the Bovidae family based on the analysis of amelogenin gene polymorphism. The studied sample set consisted of 139 individuals of domestic and wild animal species belonging to the 8 different genus of the family Bovidae including *Bos* (n=4), *Bison* (n=16), *Ovis* (n=38), *Capra* (n=65), *Rupicapra* (n=10), *Tragelaphus* (n=2), *Pseudois* (n=2) and *Hemitragus* (n=2). Samples of animal tissue obtained from farms, the mountain hunters club, reserves and zoos were used as biological material. The literature sources, recommendations of the International Society of Animal Genetics (ISAG) on markers for sex determination as well as amelogenin gene sequences deposited in the gene bank of the NCBI served as the basis for the test system development. The primers SE47 (forward: 5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3') and SE48 (reverse: 5'-CCCGCTTG-GCTTGCTGTTGC-3') were selected to amplify the amelogenin gene fragment, flanking the site with the Y-chromosome-specific deletion. To develop the test system, the possibilities of visual detection of amplicons by gel electrophoresis in agarose gel, as well as laser detection by capillary electrophoresis on an ABI3130xl DNA analyzer (Applied Biosystems, USA) were taken into account. As a result, differences in fragment lengths for the X and Y chromosomes in males and females of all studied species were identified, visually determined by gel electrophoresis. The lengths of the fragments specific for the X chromosome, depending on the species of animals, were 264 or 280 bp, for the Y chromosome — 202 or 217 bp. Using the genetic analyzer ABI3130xl allowed the implementation of the automatic laser detection of the obtained amplicons, which makes it possible to integrate the developed test system into the multiplex microsatellite analysis systems.

Key words: genus and species of the family Bovidae, sex determination, amelogenin gene.

Authors:

Petrov S. — PhD (Biol. Sci), senior researcher; e-mail: citelekle@gmail.com;

Kharzinova V. — PhD (Biol. Sci), leading researcher; e-mail: veronika0784@mail.ru;

Kostyunina O. — Dr. Habil. (Biol. Sci), leading researcher (e-mail: kostolan@yandex.ru);

Dotsev A. — PhD (Biol. Sci), leading researcher (e-mail: asnd@mail.ru);

Zinovieva N. — Dr. Habil. (Biol. Sci), Academician of RAS, Director, e-mail: n_zinovieva@mail.ru.

Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, 142132, Moscow region, Podolsk city district, Dubrovitsy settlement, 60.

References

1. Lau E. C. Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes / E. C. Lau, T. K. Mohandas, L. J. Shapiro, H. C. Slavkin, M. L. Snead // *Genomics*. — 1989. — № 4. — P. 162–168.
2. Sasaki S. The amelogenin gene / S. Sasaki, H. Shimokawa // *Int. J. Dev. Biol.* — 1995. — № 39. — P. 127–133.
3. Nakahori Y. Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer / Y. Nakahori, K. Hamano, M. Iwaya, Y. Nakagome // *Am. J. Hum. Genet.* — 1991. — № 39. — P. 472–473.
4. Gibson C. W. Bovine amelogenin message heterogeneity: Alternative splicing and Y-chromosomal gene transcription / C. W. Gibson, E. Golub, W. R. Abrams, G. Shen, W. Ding, J. Rosenblom // *Biochemistry*. — 1992. — № 31. — P. 8384–8388.
5. Pfeiffer I. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*) / I. Pfeiffer, B. Brenig // *BMC Genetics*. — 2005. — № 6. — 16 p.
6. Chen A. Q. Sexing Goat Embryos by PCR Amplification of X- and Y- chromosome Specific Sequence of the Amelogenin Gene / A. Q. Chen, Z. R. Xu, S. D. Yu Asian-Aust // *J. Anim. Sci.* — 2007. — № 20(11). — P. 1689–1693.
7. Weikard R. Amelogenin cross-amplification in the family bovidae and its application for sex determination, molecular reproduction and development / R. Weikard, C. Pitra, C. Kühn // *Mol. Reprod. Dev.* — 2006. — № 73. — P. 1333–1337.
8. Pajares G. A sexing protocol for wild ruminants based on PCR amplification of amelogenin gene AMELX and AMELY / G. Pajares, I. Alvarez, I. Fernandez, L. Perez-Paravol, F. Goyache, L. I. Royo // *Arch. Tierz. Dummerstorf*. — 2007. — № 50(5). — P. 442–446.
9. Ennis S. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus / S. Ennis, T. F. Gallagher // *Anim. Genet.* — 1994. — № 25. — P. 425–427.
10. Malik H. N. A single blastomere sexing of caprine embryos by simultaneous amplification of sex chromosome-specific sequence of SRY and amelogenin genes / H. N. Malik, D. K. Singhal, A. Mukherjee, N. Bara, S. Kumar, S. Saugandhika, A. K. Mohanty, J. K. Kaushik, S. Bag, B. C. Das, S. K. Bhanja, D. Malakar // *Livestock Science*. — 2013. — № 157. — P. 351–357.
11. Yamauchi K. Sex determination based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in sika deer (*Cervus nippon*) / K. Yamauchi, S. I. Hamasaki, K. Miyazki, T. Kikusui, Y. Takeuchi, Y. Mori // *J. Vet. Med. Sci. SO*. — 2000. — P. 669–671.
12. Yamamoto K. Sex identification of Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*, by PCR based on amelogenin gene / K. Yamamoto, T. Tsubota, T. Komatsu, A. Katayama, T. Murase, I. Kita, T. Ku-do // *Theriogenology*. — 2002. — № 64. — P. 505–508.
13. Pidancier N. Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia, Artiodactyla): discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies / N. Pidancier, S. Jordan, G. Luikart, P. Taberlet // *Mol. Phylogenet. Evol.* — 2006. — № 40(3). — P. 739–449.
14. Kim B. J. Species and sex identification of the Korean goral (*Nemorhaedus caudatus*) by molecular analysis of non-invasive samples / B. J. Kim, Y. S. Lee, J. H. An, H. C. Park., H. Okumura, H. Lee, M. S. Min // *Mol. Cells*. — 2008. — № 26(3). — P. 314–8.