

# APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE POLIMORFISMO DE DNA EN LA RESOLUCIÓN DE CASOS DE ABIGEATO, IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL Y DETERMINACIÓN DE PATERNIDAD.

G. Giovambattista, M.V. Ripoli, J.P. Lirón, M.E. Kienast, E.E Villegas  
Castagnaso, F.N. Dulout, P. Peral García

Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA)  
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

**Resumen:** La tipificación de los grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos a partir de muestras de sangre y suero sigue siendo el estándar internacional para la certificación de paternidad. En la actualidad, las mencionadas técnicas pueden ser suplementadas con marcadores moleculares de herencia mendeliana codominante, que permiten por primera vez contar con pruebas de inclusión. El objetivo del presente trabajo consistió en resolver casos de identificación individual, paternidad y abigeato, a partir de muestras no convencionales (músculo, cuero, pelos, semen, sangre, riñón y corazón) aplicando marcadores moleculares. El DNA genómico se extrajo mediante una modificación del método descrito por Wagner y col., (1994). Los loci del BoLA y los microsatélites equinos y bovinos se analizaron mediante las técnicas de PCR-RFLP y PCR-geles de secuenciación, respectivamente. En el 95 % de las muestras analizadas se extrajo DNA de calidad periciable, resolviéndose el 86 % de los casos. Los valores obtenidos para el índice «L» variaron desde 1 en 21.762 hasta 1 en 329.025.477 en los casos donde no se pudo realizar la exclusión, lo cual significa que existe una probabilidad entre 21762 y 329025477 de que los genotipos coincidan por azar. En el presente trabajo se demuestra que el análisis de polimorfismos del DNA es una herramienta de utilidad para resolver casos de identificación individual, paternidades y abigeato a partir de muestras no convencionales.

**Palabras claves:** BoLA, microsatélites, identificación individual, verificación de paternidad, bovinos, equinos.

## THE USE OF MOLECULAR MARKERS FOR INDIVIDUAL IDENTIFICATION, PATERNITY TEST AND DAILY ROB CASES

**Abstract:** Up to date, the international standard for individual identification and paternity test of domestic animals are performing through blood groups and biochemistry polymorphisms of blood samples. However these techniques may be improved by the use of molecular markers. The main characteristics of them are codominant Mendelian heredity and highly polymorphisms. The aim of the present work is to apply molecular markers to resolve individual identification, paternity test and daily rob cases using no conventional samples. These samples included muscular tissue, skin, hair, semen, blood, kidney and heart. Genomic DNA were extracted using the modified method described by Wagner et al., (1994). BoLA and equine and bovine microsatellites loci were typing by PCR-RFLP and PCR-sequencing gel methods. Positive amplification could be obtained in the 95 % of the genomic DNA extracted from the analyzed samples. In addition, the 86 % studied cases could be resolved. In that cases where is not possible of made an exclusion, the "L" index is between 1 in 21762 - 1 in 329025477. It means that is one chance between 21762 - 329025477 that the genotypes are the same by random. In the present paper it is prove that the use of molecular markers is a useful tool to solve cases of individual identity, determination of paternity and daily rob using not common samples.

**Key words:** BoLA, microsatellites, individual identification, paternity test, bovine, equine.

Fecha de recepción: 05/05/00

Fecha de aprobación: 08/08/01

**Dirección para correspondencia:** G. Giobambattista. CC 296 (B1900 AVW) La Plata, ARGENTINA.

Tel/Fax N°: 54 221 4211799.

**E-mail:** ggiovam@fcv.medvet.unlp.edu.ar.

## INTRODUCCIÓN

Con anterioridad al desarrollo de las técnicas moleculares, la identificación de un individuo sólo se podía realizar mediante el empleo de tatuajes, caravanas o mediante descripciones fenotípicas. De la misma manera, la determinación de la paternidad debía resolverse de acuerdo al parecido fenotípico entre los supuestos padres y la cría.

A comienzo del siglo XX, Landsteiner (1) abre el camino de la identificación mediante marcadores genéticos, al evidenciar la existencia de polimorfismos en los grupos sanguíneos humanos, ya que no todas las personas poseen el mismo tipo de glóbulos rojos. Así, por primera vez, los individuos se podían agrupar sobre la base de un criterio objetivo y se acuñó el término "marcador genético".

Luego de varias décadas, este criterio se consideró válido para la identificación de animales domésticos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), incorporándose nuevos tipos de marcadores genéticos, como los polimorfismos proteicos correspondientes al sistema de histocompatibilidad (puesto de manifiesto por reacciones inmunológicas) (9, 10, 11, 12) y los polimorfismos bioquímicos (identificados mediante técnicas electroforéticas) (8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

Estos hitos constituyeron un gran avance para la identificación de animales domésticos, ya que se contaba por primera vez con una batería de marcadores genéticos polimórficos, que cumplía con las características fundamentales para ser utilizada en las pruebas de identificación individual y de verificación de parentesco.

En la década de los ochenta, surgen las técnicas de análisis del DNA. Las mismas permitieron analizar el polimorfismo presente tanto en las secuencias codificantes, como en las no codificantes (por ejemplo minisatélites y microsatélites). En 1985, Jeffreys y col. (21), desarrollaron la metodología denominada "DNA fingerprinting" o huella digital, la que se basa en el análisis de una clase de secuencias repetidas denominadas minisatélites (22, 23, 24, 25, 26, 27).

En 1987, Mullis y Faloona (28) producen un hecho revolucionario al idear la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta metodología consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de DNA específico utilizando una polimerasa termoestable (*Taq* Polimerasa), permitiendo en forma sencilla el análisis de los polimorfis-

mos presentes en el DNA. Además, presenta las siguientes ventajas en relación a la técnica de fingerprinting: a) no es exigente en cuanto a la calidad y cantidad del DNA utilizado y b) es sencilla, rápida y de alta repetibilidad, pudiéndose analizar simultáneamente un elevado número de muestras.

La PCR ha sido aplicada al estudio de loci altamente polimórficos tales como:

- Los genes de clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) son los más polimórficos del genoma. Inicialmente, estos loci se tipificaron a través de reacciones inmunológicas. En 1992, van Eijk y colaboradores y van der Poel y colaboradores (29, 30) desarrollaron metodologías basadas en la técnica PCR-RFLP para caracterizar el polimorfismo presente en los loci BoLA-DRB3 y BoLA-DYA, respectivamente.

- Los microsatélites (Short Tandem Repeat, STR) son secuencias constituidas por repeticiones de di, tri o tetranucleótidos (31). En la actualidad, se han informado más de 1200 STR en bovinos (32) y más de 249 microsatélites en equinos (33).

El desarrollo de las metodologías de análisis de DNA, y especialmente la utilización de la técnica PCR para la tipificación de microsatélites, está modificando radicalmente el campo de la identificación individual en humanos y animales domésticos. Es por esta razón y dado el gran número de STR informados, que la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) y la Food and Agriculture Organization (FAO) han seleccionado y estandarizado diferentes microsatélites en las distintas especies de animales domésticas (bovinos, equinos, porcinos, caninos, ovinos, caprinos) con el fin de ser empleados para estudios de identificación y para trabajos sobre diversidad genética de razas domésticas (ej: 34, 35). Dichos marcadores han sido empleados en los test de comparación internacional (1996, 1998 y 1999) donde intervienen laboratorios de todo el mundo abocados a realizar la tipificación.

Hasta el momento la tipificación de los grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos a partir de muestras de sangre y suero, sigue siendo el estándar internacional para la certificación de paternidad. Sin embargo, se encuentra disponible una batería de marcadores moleculares altamente polimórficos, con herencia mendeliana simple y alelos de tipo codominantes. La utilización de estos marcadores permite resolver los casos de paternidad discutida con una probabilidad cercana a la unidad. Por lo tanto se puede

contar, por primera vez, con pruebas de inclusión.

La inseminación en vacas se realiza generalmente con pastillas de semen de toros que no se encuentran en el mismo establecimiento. Es por esta razón que no se pueden obtener las muestras de sangre necesarias para realizar la determinación de paternidad mediante los métodos tradicionales de tipificación. Sin embargo, es posible obtener DNA a partir de pastillas de semen y de esta manera resolver la paternidad por técnicas moleculares.

Por otra parte, la sustracción de ganado mayor es un hecho frecuente en la República Argentina. Los animales sustraídos son faenados, dejando restos de los mismos en el lugar del hecho que se pueden emplear como material periciable. A su vez, cuando los sospechosos de cuatrismo son detenidos con la posible carne robada, ésta también se tipificará del mismo modo que las muestras anteriores. Los casos de abigeato se resuelven analizando las muestras obtenidas en ambos sitios y realizando el estudio comparativo mediante las tipificaciones del DNA.

El objetivo del presente trabajo consistió en la aplicación de marcadores moleculares para resolver casos de identificación individual, paternidad y abigeato a partir de muestras no convencionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material analizado:** se utilizaron un total de 45 muestras, 29 de tejido muscular, 6 de cuero, 4 de semen, 4 de sangre, 1 de riñón y 1 de corazón. Las muestras de cuero contenían también pelos. Los casos de abigeato fueron remitidas por el Poder Judicial de la Provincia de Buenos Aires.

En las denuncias de abigeato, los restos biológicos (evidencias del robo) se recogieron en el lugar del hecho. Como consecuencia de haber estado al intemperie sufrieron distinto grado de deterioro, ya que inmediatamente después de la muerte comienzan los procesos de autólisis. Esta primera etapa de descomposición de los tejidos es seguida por la acción de microorganismos, hongos y, en un estado más avanzado, por la intervención de insectos y vertebrados. Los factores ambientales (por ejemplo, la humedad y el oxígeno) y biológicos reducen la calidad y cantidad del DNA obtenido durante la extracción (37).

Por lo antes mencionado, se presentaron inconvenientes en la tipificación genética de las

muestras que evidenciaron un estado avanzado de descomposición. Por esta razón, se utilizó el método descrito por Wagner y col., (36) para extraer DNA genómico a partir de carne en descomposición. Por el contrario, la calidad del DNA extraído y la eficiencia de la amplificación mejoraba cuando las muestras habían sido fijadas en alcohol 70 % por el personal policial, ya que los procesos de degradación del DNA pueden interrumpirse por agentes químicos naturales o artificiales.

**Extracción del DNA genómico:** El DNA genómico se obtuvo a partir de las muestras antes mencionadas mediante el método modificado descrito por Wagner y col., (36). La lisis del material biológico se realizó en un buffer de extracción con el agregado de proteinasa K, luego de la cual se purificaron a través de la técnica de "salting-out" (precipitación diferencial con acetato de sodio amonio). Posteriormente, se realizó la precipitación del DNA con isopropanol. Finalmente, el DNA obtenido fue resuspendido en agua bidestilada.

**Marcadores genéticos utilizados:** Todos los marcadores se tipificaron mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En bovinos se amplificaron dos loci del BoLA (BoLA-DRB3 y BoLA-DYA) y seis microsatélites (MGTG7, TGLA53, TGLA126, BM2113, SPS115, MS513). En equinos las amplificaciones se realizaron empleando nueve microsatélites (AHT4, AHT5, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, VHL20).

La identificación de las variantes de los genes BoLA-DRB3 y BoLA-DYA se realizó mediante las técnicas de PCR-RFLP y PCR-ACRS descritas por van Eijk y col., (29) y van der Poel y col., (30), respectivamente.

El polimorfismo presente en los microsatélites se tipificó, en base a su peso molecular, mediante la utilización de geles de secuenciación desnaturalizantes y su posterior tinción con nitrato de plata.

**Análisis Estadístico:** La primera etapa consistió en realizar la exclusión de los animales. En las disputas de paternidad, se descartó al padre alegado de una cría cuando el macho en cuestión no evidenciaba el alelo paterno en alguno de los loci. En el caso que el alelo paterno no pudo ser determinado, la exclusión se realizó cuando el macho y la cría no compartían ningún alelo. En los casos forenses, se realizó la exclusión cuando no existía correspondencia entre los genotipos observados para las muestras encontradas en el lugar

del hecho y las secuestradas a los sospechosos.

En la etapa siguiente se estimó el índice de paternidad (L), que permite calcular la probabilidad que el padre alegado sea el padre biológico, conociendo los genotipos madre-cría-padre. El índice de paternidad para un locus es igual a:

$$(1) \quad L = \frac{1}{2P}$$

siendo P, la frecuencia génica del alelo paterno en la población. Dado que son probabilidades independientes la probabilidad total del índice de paternidad será igual a la multiplicación del aporte de cada locus.

En casos forenses el parámetro L se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$(2) \quad L = \frac{1}{2P_1}$$

siendo P<sub>1</sub> la frecuencia poblacional del genotipo presente en las evidencias.

De la misma manera que en el caso anterior, cuando se analizan varios loci el valor de P es igual a:

$$\tilde{P} = \prod_i \tilde{P}_i$$

La probabilidad de exclusión y el valor del Índice de Paternidad dependen del número de alelos, de sus frecuencias génicas y del número de loci utilizados.

## RESULTADOS

En el presente trabajo, se extrajo DNA genómico de calidad periciable a partir de diferentes tipos de muestras biológicas, tales como tejido muscular, cuero, pelos, semen, sangre, riñón y corazón. En el 95 % de las muestras recibidas se obtuvieron amplificaciones positivas tanto para los microsatélites como para los loci del BoLA.

En este estudio se planteó la utilización de marcadores moleculares para resolver tres tipos de situaciones:

I. Identificación de individuos a partir de muestras de semen. Este estudio consistió en identificar, entre tres muestras de semen, cuáles correspondían al mismo reproductor. El análisis de los marcadores genéticos utilizados permitió determinar que las muestras 1 y 3 pertenecían al mismo toro, mientras que la pastilla de semen 2 correspondía a otro individuo (Figura 1).

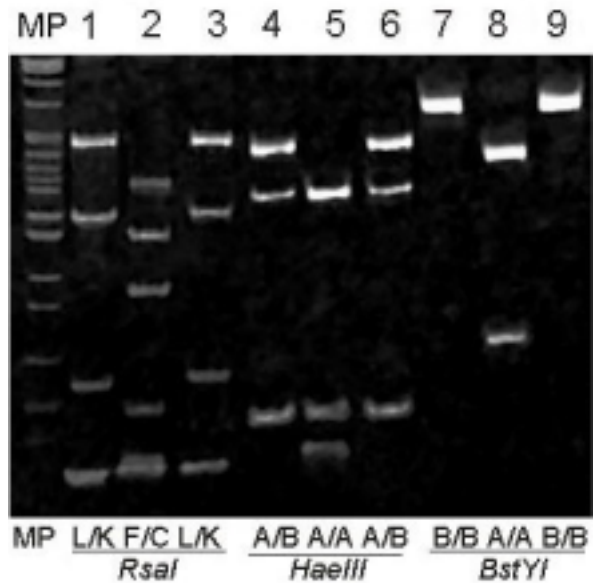


Figura 1. Los productos de amplificación correspondientes al locus BoLA-DRB3 fueron digeridos con las enzimas RsaI, HaeIII y BstYI. Los fragmentos digeridos fueron separados en geles acrilamida/bisacrilamida 6% (19:1) 1x TBE. MP: marcador de peso molecular (PBR322 digerido con MspI); calles 1 - 3: muestras 1, 2 y 3 digeridas con RsaI; calles 4 - 6: muestras 1, 2 y 3 digeridas con HaeIII; calles 7 - 9: muestras 1, 2 y 3 digeridas con BstYI.

Figure 1. BoLA-DRB3 PCR products were digested with RsaI, HaeIII and BstYI restriction enzymes. Restriction fragments were resolved by 6% (19:1) 1x TBE polyacrylamide gel electrophoresis. MP: Molecular Weight Marker (MspI digest of pBR322); lanes 1 - 3: samples 1, 2 and 3 digested with RsaI; lanes 4 - 6: samples 1, 2 and 3 digested with HaeIII; lanes 7 - 9: samples 1, 2 and 3 digested with BstYI.

## II. Determinación de paternidad de crías de inseminación artificial.

Es un hecho cada vez más común que se inseminen animales con pastillas de semen. En muchos de estos casos el toro no está disponible o se encuentra en el extranjero. Es por esta razón que no se puede obtener las muestras de sangre necesarias para realizar la prueba de paternidad a partir de los métodos tradicionales: grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos. Sin embargo, es posible resolver estos casos comparando el patrón de DNA correspondiente a la pastilla de semen del progenitor alegado con los de la cría y la madre.

En la determinación de paternidad que se muestra en la figura 3, la comparación de los genotipos de la madre y la cría permitió determinar el alelo paterno (obligado) para cada locus. Como

dichas variantes se encontraban presentes en los genotipos del padre alegado, este individuo no pudo ser excluido de la paternidad. En base a los resultados obtenidos, se estimó que existía una probabilidad de inclusión de  $1,7 \times 10^{-6}$ , siendo 1 en 585.277 la posibilidad que el padre sospechado sea el padre biológico.

III Resolución de casos de abigeato. El robo de ganado mayor es un hecho frecuente en la República Argentina. Usualmente, los ladrones faenan los animales en el lugar del hecho y dejan restos de los mismos. Cuando los sospechosos de cuatrерismo son detenidos con la posible carne robada, el material biológico secuestrado en los dos sitios puede ser comparado mediante técnicas de DNA y de esta manera puede resolverse este tipo de casos.

A pesar del deterioro biológico de las muestras, ya mencionado en materiales y métodos, se pudo resolver el 86% de los casos analizados. Como se observa en la figura 2, los genotipos de las evidencias del abigeato obtenidos para un determinado locus coincidieron con los observados

en las muestras de carne secuestradas a los sospechados de hurto. En los casos de abigeato donde no se pudo realizar la exclusión, los valores obtenidos para el índice "L" (estimados según fórmula 2) variaron desde 1 en 21.762 hasta 1 en 329.025.477. Lo cual significa que existe una chance entre 21.762 y 329.025.477 de que los genotipos coincidan por azar.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra que el análisis de polimorfismos del DNA es una herramienta de utilidad para resolver identificación individual, determinación de paternidades y casos de abigeato. Actualmente en la Argentina, las pruebas de identificación individual y las verificaciones de paternidad oficialmente aceptadas se realizan mediante el análisis de polimorfismos bioquímicos y grupos sanguíneos. Los métodos serológicos y de electroforesis de proteínas tienen algunas desventajas insalvables para los casos tratados en el presente trabajo. Dado que el polimorfismo presente en estos marcadores se detecta mediante colorantes, reacciones enzimáticas o inmunológicas, las muestras tienen que ser frescas,

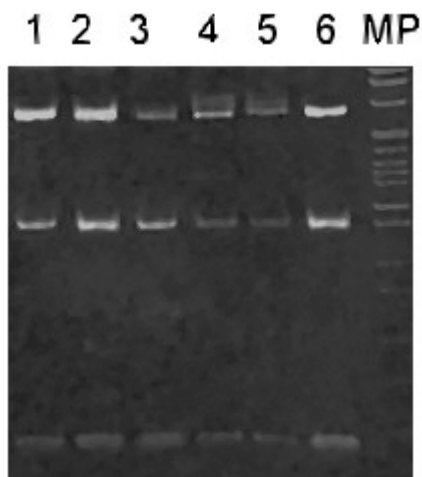


Figura 2. Los productos de amplificación correspondientes al locus BoLA-DRB3 fueron digeridos con la enzima *RsaI*. Los fragmentos digeridos fueron separados en geles acrilamida/bisacrilamida 6 % (19:1) 1x TBE. Calle 1: animal faenado; calles 2 - 6: muestras biológicas secuestradas al sospechoso. MP: marcador de peso molecular (PBR322 digerido con *MspI*).

Figure 2. BoLA-DRB3 PCR products were digested with *RsaI* restriction enzyme. Restriction fragments were resolved by 6% (19:1) 1x TBE polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1: dead animal (reference sample); lanes 2 - 6: evidences collected from the suspected butcher; MP: Molecular Weight Marker (*MspI* digest of pBR322).

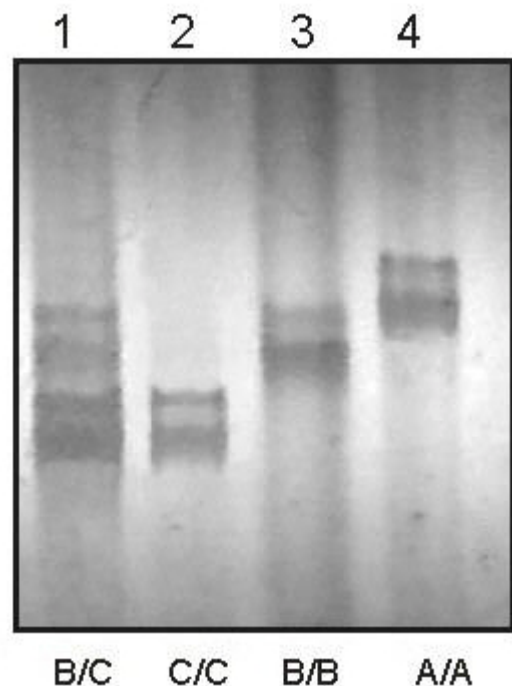


Figura 3. Los productos de amplificación correspondientes al microsatélite D23S5 fueron separados en geles desnaturalizantes de acrilamida/bisacrilamida 5 % (19:1) 1x TBE. Calle 1: vaca; calle: 2: ternero; calles 3 y 4: toros sospechados de la paternidad del ternero.

Figure 3. D23S5 microsatellite PCR products were resolved by 5% (19:1) 1x TBE polyacrylamide denaturing sequencing gel. Lane 1: dam; lane 2: offspring; lanes 3 and 4: putative sires.

ya que las proteínas se deterioran con gran facilidad.

Además, los valores de inclusión obtenidos por marcadores de DNA altamente polimórficos como los microsátélites permiten obtener índices de paternidad del 99,99 %, valor superior a los obtenidos por los métodos tradicionales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Landsteiner K. Ueber heterogentisches Antigen und Hapten. *Biochem Zeitsch.* 1900, 119:294-306.
2. Dujarric de la Rivere R, Kossowiyeh N. Sur les groupes sanguins des chevaux. *CR Seanc Soc Biol.* 1927, 97:373.
3. Ferguson LC. Heritable antigen in the erythrocytes of cattle. *J Immunol.* 1941, 40:213.
4. Stormont C, Irwin R. On the differentiation of fraternal and identical twins in cattle. *Jour An Sc* 1948, 7:516. Abstract.
5. Stormont C, Susuki Y. Genetics systems of blood groups in horses. *Genetics.* 1961, 50:915-929.
6. Stone WH, Irwin M. The J substance of cattle. I. Developmental and immunogenetic studies. *J Immunol.* 1954, 73:397.
7. Podliachouk L. Les antigènes des groupes sanguins des équidés et leurs transmission héréditaire. Thèse Doc Es-Sci, Paris. 1957.
8. Braend M, Rendel J, Gahne B, Adalsteinsson S. Genetic studies on blood groups, transferrins and hemoglobins in Iceland cattle. *Hereditas.* 1962, 48:264.
9. Amorena B, Stone WH. Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science.* 1978, 201:159-160.
10. Spooner RL, Leveziel H, Grosclaude F, Oliver RA, Vaiman MJ. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BoLA) in cattle. *J Immunogenetics.* 1978, 5: 325-346.
11. Lazary S, Antczak D F, Bailey E, Bell TK, Bernoco D, Byrns G, Mc Clure JJ. Joint report of the First International Workshop on Lymphocyte Alloantigens of the Horses. *Animal Genetics.* 1987, 19:447-456.
12. Alexander L J, Stewart AF, Mackinaly AG, Kapelinskaya KW, Tkach TM, Gorodetsky SI. Isolation and characterization of the bovine k-casein gene. *Eur J Biochem.* 1988, 178:395-401.
13. Smithies O, Hickman CG. Inherited variations in the serum proteins of cattle. *Genetics.* 1959, 43:374.
14. Braend M, Stormont C. Studies on an haemoglobin and transferrin types of horses. *Nord Vet Med.* 1964, 16:31-37.
15. Braend M, Efremov G. Polymorphism of cattle serum albumin. *Nord Vet Med.* 1965, 17:585.
16. Franks D. Horses Blood Groups and Hemolytic diseases of the new born foal. *Ann N Y Acad Sci.* 1962, 97(1):237-250.
17. Podliachouk L, Hessel Holt M. Les groupes sanguins des équidés les sérums de référence. *The Immunogenetic Letter.* 1962, 2:69-71.
18. Samberg K. Blood typing horses: currents status and application to identification problems. *First World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.* 1974, 253-264.
19. Bowling AT, Clark RS. Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horse in the Unites States. *Anim Blood Grps Biochem Genet.* 1985, 16:93-108.
20. Giovambattista G, Peral García P, Kienast ME, Ripoli MV, Dulout FN. Nuevas tendencias en la identificación de animales domésticos. *Agro Sur.* 1997, 25 (1): 106-113.
21. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature.* 1985, 316:76-79.
22. Georges MAS, Lequarre M, Castelli R, Hanset G, Vassart G. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogent. Cell Genet.* 1988, 47:127-131.
23. Georges M, Lathrop M, Hilbert P, Marcotte A, Schwers A, Swillens S, Vassart G, Hanset M. On the use of DNA fingerprints for linkage studies in cattle. *Genomics.* 1990, 6:461-474.
24. Kirby LT. DNA Fingerprinting. Stockton press, New York, 375 pp. 1990.
25. Haberfeld A, Cahaner A, Yoffe O, Plotsky Y, Hillel J. DNA fingerprints of farm animals generated by minisatellite and minisatellite DNA probes. *Animal Genetics.* 1991, 22(3):299-306.
26. Dolf G, Glowatzki ML, Gaillard C. DNA fingerprinting in cattle using the probe pV47. *Animal Genetics.* 1992, 23(1):63-70.
27. Mannen H, Tsuji S, Mukai F, Goto N, Ohtagaki S. Genetic similarity using DNA fingerprinting in cattle to determine relationship coefficient. *J of Heredity.* 1993, 84:166-169.
28. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol.* 1987, 155:335-350.
29. Van Eijk MJT, Stewart-Haynes JA, Lewin HA. Extensive polymorphism of BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics* 1992, 23: 483-496.
30. Van der Poel JJ, Groenen MA, Dukhof RJM, Ruyter D, Giphart MJ. The nucleotide sequence of the bovine MHC class II alpha gene: DRA, DQA and DYA. *Immunogenetics.* 1990, 31: 29-36.
31. Ellegreen H. Genome analysis with minisatellite markers. Department of animal breeding y genetics, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 1993.

32. Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TPL, Lopez-Corrales NL, Beattie CW. A second generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*. 1997, 7 : 235 - 249.
33. Shieu YL, Bickel LA, Caetano AR, Millon LV, Clark RS, Eggleston ML, Michelmore R, Bailey E, Guérin G, Godard S, Mickelson JR, Valberg SJ, Murray JD, Bowling AT. A sinteny map of the horse genome comprised of 240 microsatellite and RAPD markers. *Animal Genetics*. 1999, 30:1-9.
34. Bates S, Holm T, Van Haeringen H, Lange K, Ziegle J, Heyen D, Da Y, Lewin H. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellites markers in fluorescent multiplexes for automated parentage verification. *Proceeding of the XXV International Society for Animal Genetics*. 1996, 69.
35. Bozzini M, Fantin D, Ziegle J, Van Haeringen H, Jacobs W, Ketchum M, Spencer M y Bates S. Automated equine paternity testing. *Proceeding of the XXV International Society for Animal Genetics*. 1996, 51.
36. Wagner V, Schild TA, Geldermann H. Application of polymorphic DNA sequences to differentiate the origen of decomposed bovine meat. *J Forensic Sci.* 1994, 64: 89-95.
37. Herrmann B, Hummel S. *Ancient DNA*. Springer-Verlag, New York Inc., 263 pp. 1994.