

## DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION DES RÉSULTATS DU GÉNOTYPAGE DES PORCS A L'AIDE DE MARQUEURS ADN HAPLOÏDES

Yelyzaveta POCHERNIAIEVA<sup>1\*</sup>, Konstantin POCHERNYAIEV<sup>2</sup>,  
Artem POCHERNIAIEV<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Etudiant diplômé «Technologies de production et de transformation des produits d'élevage»,  
chercheuse junior au laboratoire de génétique,

Institut d'Elevage Porcin et de Production Agro-industrielle de l'Académie Nationale des Sciences Agraires Ukraine

<sup>2</sup>Docteur en sciences agricoles, Directeur adjoint de la recherche, de la production et des activités financières  
Institut d'Elevage Porcin et de Production Agro-industrielle de l'Académie Nationale des Sciences Agraires Ukraine

<sup>3</sup>Expert médico-légal dans le secteur de la recherche biologique et de la comptabilité,  
Poltava Research Expert Forensic Center du ministère de l'Intérieur de l'Ukraine

Yelyzaveta Pocherniaieva, [budakvayelyzaveta@gmail.com](mailto:budakvayelyzaveta@gmail.com)

**Résumé.** Cet article présente les résultats du développement et de la validation d'une technique d'extraction de l'ADN. Il a été constaté que la méthodologie développée présente une activité d'hybridation prononcée en relation avec la matrice ADN à 65°C avec la concentration d'ions magnésium dans le mélange réactionnel 1,5 mM/μl. Indicateurs présentés test de sensibilité, Limites de détection et spécificité de la méthodologie, indiquant qu'il peut être utilisé pour détecter ADN transfecté. Cette méthode a été utilisée pour détecter les empreintes d'ADN transfectées sous forme de contamination des échantillons étudiés de poils provenant de l'oreille de porcs (n=12). Le typage de l'ADN pour identifier le génome mitochondrial de porcs hybrides a été effectué en examinant des échantillons de poils et de tissu épithélial d'oreilles de porc. Les empreintes de traces détectées fournissent des preuves objectives pour caractériser les traces d'ADN de cadavres d'autres échantillons biologiques, trouvé sur la « scène de crime », lors de l'échantillonnage lors de l'abattage de porcs dans une usine de transformation de la viande. Cependant, le typage de l'ADN à partir d'échantillons allant jusqu'à 10 cheveux est souvent problématique en « médecine légale ». Une laine de porc contient une très petite quantité d'ADN ou un échantillon de laine se compose de laine avec des racines de mauvaise qualité ou même des tiges de cheveux cassées sans racines. Les échantillons prélevés avant l'étude ont été traités avec de l'eau distillée. En raison du fait que les oreilles des porcs étaient avec des impuretés de sang, de la saleté de poussière. L'extraction de l'ADN des poils a été réalisée à l'aide de la résine échangeuse d'ions Chelex-100, selon des recommandations méthodiques (Korinnyi S.M., Pochernyaev K.F., Balatsky, V.M., 2005). Il n'a pas été possible de valider les résultats du génotypage à l'aide de la méthode d'extraction de l'ADN à partir d'échantillons de poils, en raison du fait que des traces d'ADN étranger, des cadavres d'ADN de porcs ont été trouvés dans les échantillons étudiés lors de l'abattage à l'usine de transformation de la viande. Ceci est mis en évidence par la méthode très sensible de l'analyse PCR et hydrolyse par l'endonucléase *TasI* du site variable étudié de la boucle D d'ADNmt de porcs. Comme en témoigne la détection des résultats de l'électrophorégramme, sur lesquels des fragments contaminés non spécifiques sont clairement visibles – ADN transfecté. Nous décrivons ici une étude pilote d'une méthode d'extraction de l'ADN du tissu épithélial des oreilles de porc et quantification à l'aide de l'analyse PCR. Avant d'extraire l'ADN du tissu épithélial des oreilles de porc les échantillons testés ont été traités - feu flamboyant. L'extraction d'ADN à partir du tissu épithélial de l'oreille du porc a été réalisée par la méthode du sorbant en utilisant Kit de réactifs pour l'isolation de l'ADN "DNA-sorb-B" de «TOV InterLabService - Ukraine». Traitement préliminaire des échantillons d'essai avec le feu de l'alcool sec s'est avérée être une méthode efficace basée sur les résultats de l'analyse PCR boucle D de la région variable du génome mitochondrial de porcs hybrides. L'ADNmt haploïde transporté par les mitochondries du cytoplasme cellulaire a un mode de transmission maternel (les animaux héritent de l'ADNmt de leur mère et non de leur père). Ces caractéristiques permettent de reconstruire les relations intra-évolutives en évaluant des modèles de mutations de l'ADNmt. Les

polymorphismes dans la région hypervariable de la boucle D ont grandement contribué à l'identification des descendants sauvages d'espèces porcines domestiques et à la création de modèles géographiques de diversité génétique. Les marqueurs X-mitochondriaux sont utilisés pour l'identification en cas d'absence de maternité, analyse de traces mixtes d'ADN mâle et femelle de cadavres de porcs. Les marqueurs X-SNP sélectionnés conviennent à la détermination des haplogroupes européens les plus importants. Mise au point d'une méthode pour désactiver l'ADN transfecté a permis de déterminer les véritables haplotypes des échantillons étudiés. Les haplotypes suivants ont été identifiés: 3 porcs atteints de l'haplotype C - sous-espèces de porc sauvage, Landrace, Hampshire, Pays de Galles (en anglais: Wales) (Ukraine, Pologne); 1 cochon est un représentant sous-espèces de porc sauvage, Wales (Italie), haplotype G; 4 porcs sont des représentants de l'haplotype O - sous-espèces de porc sauvage, Landrace (Suède); 2 porcs sont porteurs de l'haplotype N - Grand Blanc (en anglais: Large White) (type asiatique); parmi l'échantillon de porcs étudié, il n'y a que 1 haplotype K - introuvable parmi les races porcines domestiques. Intérêt pour le typage du polymorphisme mononucléotidique (SNP) en criminalistique, l'expertise en génétique moléculaire ne se développe pas seulement en raison de l'utilité du SNP pour déterminer les chromosomes Y et X, haplogroupes et haplotypes ADNmt, ainsi que pour l'analyse de l'origine géographique des échantillons étudiés. Notre intérêt pour le polymorphisme SNP était motivé par les avantages potentiels des tests en raison du faible taux de mutation, en particulier dans l'analyse d'échantillons dégradés à l'aide d'amplicons de la région variable D de la boucle – 428 paires de bases. Méthodologie testée expérimentalement pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons prélevés lors de l'abattage des porcs dans l'usine de transformation de la viande «Globino» - recommandé pour une utilisation dans la pratique. Le travail a été fait avec le soutien de l'Académie nationale des sciences agraires de l'Ukraine 31.01.00.07.F. « Étudier l'effet pléiotropique des gènes le SNP utilisés dans Sélection Assistée par Marqueurs de porcine » DR № 0121U109838.

**Mots-clés:** porcs, (Large White × Landrace) × Maxgro, Marqueurs d'ADN haploïdes, ADNmt, boucle D, haplotype, PCR-RFLP, Chelex-100, kit sorbant DNA-sorb-B, TasI, validation.

### Introduction

Analyser les échantillons très peu de choses sont nécessaires la quantité de matériel à tester. Pour analyser l'ADN extrait impose une étape de multiplication rendue possible grâce à la PCR (Polymerase Chain Reaction). PCR a été découvert par un biochimiste américain Carey Mullis en 1983. L'objectif du scientifique américain a été la création d'une méthode ce qui permettra d'amplifier l'ADN lors de la multiplication des séquences de la molécule d'ADN originale grâce à une enzyme ADN-polymérase [1,2]. En 1985, le magazine Science la première publication de la méthodologie PCR est sortie. Cette méthode a révolutionné biologie moléculaire et médecine [3]. La méthode PCR (en anglais *Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism – PCR-RFLP*) basé sur la copie multiple d'une portion spécifique d'acide nucléique (ADN) à l'aide d'enzymes dans des conditions (in vitro) [4]. Seule la zone qui répond aux conditions spécifiées est copiée et dans le cas où un site (fragment) est présent dans l'échantillon à examiner. La sensibilité spécifique de la technique PCR implique une stérilité parfaite de la salle de laboratoire, équipements, consommables et solutions par conséquent, les méthodes visant à prévenir la contamination sont particulièrement importantes. En règle générale, dans les échantillons présentant une faible concentration d'ADN il peut y avoir une complication dans l'examen du profil de l'échantillon étudié et du profil des substances contaminées. En outre, chaque spécimen étudié, les objets, les équipements de laboratoire sont des sources potentielles d'ADN contaminé. Pendant le fonctionnement, il existe une bonne quantité de copies d'ADN dans l'air et sur les surfaces des objets de laboratoire. Les différentes sources de contamination des échantillons d'essai nécessitent des méthodes différentes pour éviter la contamination. La contamination des échantillons et des surfaces peut survenir à n'importe quel stade du travail. Pré-laboratoire - contamination du sujet avec de l'ADN étranger transfecté, propre ADN sur le site de prélèvement de matériel biologique, contamination involontaire d'un objet unique avec

du matériel d'ADN provenant d'un autre objet par une utilisation négligente de l'appareil, incapacité à traiter ou à remplacer systématiquement le scalpel. Par exemple, couper l'oreille d'un porc avec un seul couteau sur un tapis roulant pendant l'abattage dans une usine de transformation de la viande. La vente des animaux au poids et à la qualité des carcasses se termine par la première transformation, dont la mise en œuvre correcte a un impact significatif sur leur valeur, exactitude de l'analyse génétique moléculaire pour l'évaluation des performances phénotypiques, établir une expertise sur le génome mitochondrial animal. Dans notre cas, des l'échantillonnage des échantillons à étudier - oreilles de porc étiquetées a été rendu possible par la réalisation des opérations technologiques suivantes: étourdissement, exsanguination et coupe d'oreille chez les porcs. Circonstances du prélèvement de matériel biologique a débouché sur le cas de la détection de fragments spécifiques dans l'examen du génome mitochondrial animal à travers des échantillons croisés - l'ADN transfecté, ce qui est caractéristique de (transfer, persistence, prevalence and recovery, *DNA-TPPR*) – comprendre l'impact de la transmission ou de la persistance d'un ADN étranger ce qui entraîne des échantillons amplifiés contaminés [5]. Il convient de noter que le défi scientifique consiste à trouver des méthodes efficaces pour désactiver les facteurs de contamination de l'ADN qui peuvent être utilisés dans un laboratoire et qui se sont avérés sûrs pour le personnel qui les utilise. Ce problème était le but de notre travail d'expertise dans la détermination du génome mitochondrial des porcs hybrides.

**Objectif de l'étude.** Développer et valider une méthodologie pour déterminer l'ADN transfecté lors du prélèvement d'échantillons sur le terrain.

#### **Matériaux et méthodes de recherche**

Le typage de l'ADN pour identifier le génome mitochondrial de porcs a été effectué en examinant 12 échantillons de cheveux et 12 échantillons de tissu épithélial d'oreilles de porc. L'extraction de l'ADN des poils a été réalisée à l'aide de la résine échangeuse d'ions Chelex-100, selon des recommandations méthodiques (Korinnyi S.M., Pochernyaev K.F., Balatsky, V.M., 2005). Les échantillons prélevés avant l'étude ont été traités avec de l'eau distillée. En raison du fait que les oreilles des porcs étaient avec des impuretés de sang, de la saleté de poussière. À l'aide d'une pince à épiler, arrachée des oreilles de porcs de 5 à 7 poils avec un bulbe racinaire de 0,5 cm de long. Le liquide plantaire contenant des impuretés provenant des poils a été enlevé avec une pointe jetable. Cette étape a été répétée 3-4 fois. Après cela, 120-150  $\mu\text{L}$  de suspension Chelex-100 à 20% ont été ajoutés au contenu des tubes et incubés pendant 6 heures à 56°C. Après avoir secoué les tubes sur Vortex, ils ont été placés dans un thermostat à semi-conducteurs et incubés pendant 8 minutes à une température de 98 °C. Cette méthode utilise la résine échangeuse d'ions Chelex® 100 et consiste en un bris cellulaire par le chauffage à de hautes températures (100°C) et à la liaison des composés 'non-ADN' à la résine. L'extraction d'ADN à partir du tissu épithélial de l'oreille du porc a été réalisée par la méthode du sorbant en utilisant Kit de réactifs pour l'isolation de l'ADN "DNA-sorb-B" de «TOV InterLab Service - Ukraine». Les échantillons préexaminés ont été traités avec un coton-tige trempé dans de l'alcool éthylique. Après traitement, les échantillons ont été enflammés avec du feu d'alcool sec pendant 4-5 secondes. L'extraction de l'ADN a été effectuée selon le protocole du fabricant. Si nécessaire, des tubes à essai avec des produits PCR ont été stockés à -20 ° C.

**Amplification du polymorphisme de longueur de fragment (AFLP-PCR).** AFLP-PCR ou simplement AFLP est un outil basé sur la PCR utilisé dans la recherche génétique, la prise d'empreintes ADN et la pratique du génie génétique. La technologie AFLP a la capacité de détecter simultanément divers polymorphismes dans différentes régions génomiques. Cependant, les données résultantes ne sont pas notées comme des polymorphismes de longueur, mais plutôt comme des polymorphismes de présence-absence [8,9]. Tous les échantillons de poils et de tissu épithélial ont été soumis à une amplification par PCR. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification par PCR étaient les suivantes: MITPRO 2F – *CATACAAATATGTGACCCCAA*; MITPRO R: *GTGAGCATGGGCTGATTAGTC*. Les zone de boucle-D du génome mitochondrial d'un porc d'une taille de 428 paires de bases sont soumises à une analyse. La réaction a été portée à un volume final de 20  $\mu\text{l}$  contenant 25-100 ng d'ADN matriciel. 1.0  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$ ., 0.25  $\mu\text{l}$  de chaque

amorce, 1,25 µl de dNTP, tampon de réaction NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1X, 0,5 µl d'ADN polymérase Taq de (Thermo Scientific™) et de l'eau stérile ultrapure pour atteindre un volume final de 5.0 µl. Toutes les amplifications ont été réalisées en combinaison avec un contrôle négatif (eau distillée). L'amplification des fragments d'ADN a été confirmée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 % en poids. Coloré avec du bromure d'éthidium (10 mg/ml) et visualisé sous lumière UV.

**Polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP).** RFLP - une méthode de détermination de l'empreinte génétique par des marqueurs moléculaires de l'hérédité de type X-maternel ou Y-paternel, ainsi que des échantillons d'ADN mélangés [11,12]. Les polymorphismes de longueur de fragment de restriction (RFLP) sont identifiés à l'aide d'enzymes de restriction qui coupent l'ADN uniquement à des sites de restriction spécifiques [11,13].

Le clivage enzymatique a été effectué dans un volume final de 30 µl, dont 10 µl (~0,1-0,5 µg d'ADN) de produit PCR. 1 µl d'endonucléase *TasI* (Thermo Fisher Scientific) et 2 µl de tampon B 10X avec de l'eau exempte de nucléase jusqu'à ce que le volume final soit atteint. Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 3 heures et 10 minutes.

**Détection et analyse de produits PCR.** Le produit d'une PCR est constitué d'un ou plusieurs fragments d'ADN. La détection et l'analyse des produits de la PCR peuvent être effectuées par électrophorèse sur gel d'agarose et acrylamide [7]. Les produits de l'hydrolyse de l'ADN ont été analysés à 8% des PAGE dans un tampon tris borate 1x à l'intensité du courant (5V/cm) longueurs de gel. Les plasmides d'ADN ont été utilisés comme marqueur de poids moléculaire *pBR322 DNA/MspI* et *pUC19 DNA/MspI*. Visualisation des produits de restriction a été réalisée par coloration bromure d'éthidium et visualisation sur transilluminateur en lumière UV.

### Résultats et Discussion

Il n'a pas été possible de valider les résultats du génotypage à l'aide de la méthode d'extraction de l'ADN à partir d'échantillons de poils, en raison du fait que des traces d'ADN étranger, des cadavres d'ADN de porcs ont été trouvés dans les échantillons étudiés lors de l'abattage à l'usine de transformation de la viande. Ceci est mis en évidence par la méthode très sensible de l'analyse PCR et hydrolyse par l'endonucléase *TasI* du site variable étudié de la boucle D d'ADNmt de porcs. Nous décrivons ici une étude pilote d'une méthode d'extraction de l'ADN du tissu épithélial des oreilles de porc et quantification à l'aide de l'analyse PCR. Traitement préliminaire des échantillons d'essai avec le feu de l'alcool sec s'est avérée être une méthode efficace basée sur les résultats de l'analyse PCR boucle D de la région variable du génome mitochondrial de porcs hybrides. L'ADNmt haploïde transporté par les mitochondries du cytoplasme cellulaire a un mode de transmission maternel (les animaux héritent de l'ADNmt de leur mère et non de leur père). Ces caractéristiques permettent de reconstruire les relations intra-évolutives en évaluant des modèles de mutations de l'ADNmt. Les polymorphismes dans la région hypervariable de la boucle D ont grandement contribué à l'identification des descendants sauvages d'espèces porcines domestiques et à la création de modèles géographiques de diversité génétique. Les marqueurs X-mitochondriaux sont utilisés pour l'identification en cas d'absence de maternité, analyse de traces mixtes d'ADN mâle et femelle de cadavres de porcs. Les marqueurs X-SNP sélectionnés conviennent à la détermination des haplogroupes européens les plus importants. Mise au point d'une méthode pour désactiver l'ADN transfecté a permis de déterminer les véritables haplotypes des échantillons étudiés. Les haplotypes suivants ont été identifiés: 3 porcs atteints de l'haplotype **C** - sous-espèces de porc sauvage, Landrace, Hampshire, Pays de Galles (en anglais: Wales) (Ukraine, Pologne); 1 cochon est un représentant sous-espèces de porc sauvage, Wales (Italie), haplotype **G**; 4 porcs sont des représentants de l'haplotype **O** - sous-espèces de porc sauvage, Landrace (Suède); 2 porcs sont porteurs de l'haplotype **N** - Grand Blanc (en anglais: Large White) (type asiatique); parmi l'échantillon de porcs étudié, il n'y a que 1 haplotype **K** - introuvable parmi les races porcines domestiques. Intérêt pour le typage du polymorphisme mononucléotidique (SNP) en criminalistique, l'expertise en génétique moléculaire ne se développe pas seulement en raison de l'utilité du SNP pour déterminer les chromosomes Y et X, haplogroupes et haplotypes ADNmt, ainsi que pour l'analyse de l'origine géographique des échantillons étudiés. Notre intérêt pour le polymorphisme SNP était motivé par les avantages

potentiels des tests en raison du faible taux de mutation, en particulier dans l'analyse d'échantillons dégradés à l'aide d'amplicons de la région variable D de la boucle – 428 paires de bases.

Les empreintes de traces détectées fournissent des preuves objectives pour caractériser les traces d'ADN de cadavres d'autres échantillons biologiques, trouvé sur la « scène de crime », lors de l'échantillonnage lors de l'abattage de porcs dans une usine de transformation de la viande. Cependant, le typage de l'ADN à partir d'échantillons allant jusqu'à 10 cheveux est souvent problématique en « médecine légale ». Une laine de porc contient une très petite quantité d'ADN ou un échantillon de laine se compose de laine avec des racines de mauvaise qualité ou même des tiges de cheveux cassées sans racines.

Il a été constaté que la méthodologie développée présente une activité d'hybridation prononcée en relation avec la matrice ADN à 65°C avec la concentration d'ions magnésium dans le mélange réactionnel 1,5 mM/μl. Indicateurs présentés test de sensibilité, Limites de détection et spécificité de la méthodologie, indiquant qu'il peut être utilisé pour détecter ADN transfecté. Cette méthode a été utilisée pour détecter les empreintes d'ADN transfectées sous forme de contamination des échantillons étudiés de poils provenant de l'oreille de porcs (n=12).

Méthodologie testée expérimentalement pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons prélevés lors de l'abattage des porcs dans l'usine de transformation de la viande «Globino» - recommandé pour une utilisation dans la pratique. Le travail a été fait avec le soutien de l'Académie nationale des sciences agraires de l'Ukraine 31.01.00.07.F. « Étudier l'effet pléiotropique des gènes le SNP utilisés dans Sélection Assistée par Marqueurs de porcine » DR № 0121U109838.

## Références

1. JOHN, M., DAVID S. *A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR Protocols. Methods in Molecular Biology™, Humana Press.* 2003, 226, pp. 3-6. [accesat 05.02.2023]. Disponibil: <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3>
2. Mullis, K., Erlich Henry, A., Arnheim, N., Horn Glenn, T., Saiki Randall, K., Scharf Stephen, J. *Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences. Patent US-4683195-A. PubChem Patents.* 1987. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US-4683195-A>
3. Peake, I. *The polymerase chain reaction. Journal of Clinical Pathology.* 1989, 42, pp. 673-676. [accesat 12.01.2023]. Disponibil: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.42.7.673>
4. Karim, K. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. Synthetic Biology.* 2019, pp. 1-17. [accesat 10.01.2023]. Disponibil: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.86491>
5. Pochernyaev, A. K., Denysiuk, P. V., Ilchenko, M. O., Lobchenko, S. F., Pochernyaev, K. F. *Use of differential lysis for DNA isolation to confirm sperm transfection. Animal Breeding and Genetics.* 2019, 61, pp. 179-185. [accesat 08.01.2023]. Disponibil: <https://doi.org/10.31073/abg.61.20>
6. KORINNYI, S. M., POCHERNYAEV, K. F., BALATSKY, V. M. *Animal fur as a convenient object of DNA extraction for PCR analysis. Veterinary biotechnology.* 2005 (7), pp. 80–83.
7. Primer Design Tips & Tools. Thermo Fisher Scientific, Inc. [online]. 2015. [accesat 18.01.2023]. Disponibil: <http://www.thermofisher.com/ca/en/home/products-and-services/product-types/primers-oligosnucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos/primer-design-tools.html>
8. GONG-XIN, YU., ROGER, WISE. *An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid Avena. Genome.* 2000, 43(5). [accesat 15.01.2023]. Disponibil: <https://doi.org/10.1139/g00-037>
9. LUDES, B. *L'amplification génique : une révolution en médecine légale et en criminalistique Polymerase chain reaction: A revolution in legal medicine and forensic sciences. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine.* 2021, 205 (4), pp. 396-401. [accesat 12.01.2023]. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.banm.2021.01.021>

10. BUDAKVA, Y., POCHERNYAEV, K., KORINNYI, S., POVOD, M. *The use of mitochondrial genome polymorphism to establish pro-maternal breeds in the final hybrids of pigs. Grail of Science.* 2022, (12-13), pp. 198–204. [accesat 20.01.2023]. Disponibil: <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.29.04.2022.030>
11. MIYUKI, SATO, KEN, SATO. *Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2013, 1833(8), pp. 1979-1984. [accesat 18.01.2023]. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.010>
12. RAMÍREZ, OJEDA, O. A., TOMÀS, A., GALLARDO, D., HUANG, L. S., FOLCH, J. M., CLOP, A., SÁNCHEZ, A., BADAoui, B., HANOTTE, O., GALMAN-OMITOGUN, O., MAKUZA, S. M., SOTO, H., CADILLO, J., KELLY, L., CHO, I. C., YEGHOYAN, S., PÉREZ-ENCISO, M., AMILLS, M. *Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. Mol. Biol.* 2009, 26(9), pp. 2061-2072. [accesat 12.01.2023]. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/molbev/msp118>
13. GLENN, HALL, H. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analyses. Species Diagnostics Protocols.* 1996, 50, pp. 333-366. [accesat 16.02.2023]. Disponibil: <https://doi.org/10.1385/0-89603-323-6:333>