

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Andreja OPARA

**PREVERJANJE POREKLA IN DOLOČANJE GENETSKE
PRIPADNOSTI OSEBKOV TREM GLAVNIM PASMAM GOVEDA V
SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO

**PEDIGREE TESTING AND ASSIGNMENT TEST IN THREE MAIN
CATTLE BREEDS IN SLOVENIA**

M. Sc. THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 02. 11. 2015 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja genetike.

Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Peter Dovč.

Magistrsko delo je bilo opravljeno na Kmetijskem inštitutu Slovenije v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Simon Horvat

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Milena Kovač

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: izr. prof. dr. Marjeta Čandek Potokar

Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede

Datum zagovora: 30.9.2016

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Andreja OPARA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md
DK UDK 575:636.2(497.4)(043)=1.63.6
KG govedo/pasme/poreklo/starševstvo/določitveni test/molekularna genetika/
mikrosateliti/
AV OPARA, Andreja
SA DOVČ, Peter (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in
biotehniških znanosti, področje: genetika
LI 2016
IN PREVERJANJE POREKLA IN DOLOČANJE GENETSKE PRIPADNOSTI
OSEBKOV TREM GLAVNIM PASMAM GOVEDA V SLOVENIJI
TD Magistrsko delo
OP VIII, 59 str., 14 pregl., 8 sl., 53 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Namen dela je bil določiti delež napak v podatkih o poreklu z uporabo mikrosatelitnih označevalcev pri naključno izbranih teličkah v kontroli porekla in prireje v Sloveniji in ugotoviti genetsko pripadnost teličk trem glavnim pasmam goveda v Sloveniji (lisasta, črno-bela, rjava). V okviru skupnega temeljnega rejskega programa za govedo v Sloveniji smo zbrali podatke o poreklu 3404 naključno izbranih teličk v kontroli porekla in prireje. Zbrali smo vzorce dlak teličk in njihovih mater in izolirali DNK iz dlačnih mešičkov. DNK očetov smo izolirali iz vzorcev dlake in semena, ki smo ga pridobili iz osemenjevalnih centrov. Skladnost rodovniških podatkov smo preverjali z uporabo niza 12 mikrosatelitnih označevalcev. S programom STRUCTURE smo ugotavljali genetsko strukturo populacije črno-bele, rjave in lisaste pasme ter križank lisaste pasme z RH in MB v Sloveniji. Za določanje verjetnosti, s katero posamezna telička pripada določeni pasmi na podlagi genotipa, pa smo uporabili program GeneClass2. Analizo vplivov na pravilnost porekla smo izvedli z modelom logistične regresije s proceduro LOGISTIC, s statističnim paketom SAS/STAT. Ugotovili smo, da se je delež neujemanj, ki je bil največji pri lisasti pasmi (16,7 %), skozi leta zmanjševal za faktor 0,704. Lisasta pasma je imela v letu 2010 kar 6,854-krat večji obet za napake v poreklu v primerjavi z rjavou pasmo, vendar po letu 2012 med vsemi pasmami in križanji ni več statistično značilnih razlik za delež napak v poreklah. V skladu z našimi pričakovanji je bilo med podatki o očetovstvih več neujemanj kot med podatki o materinstvih. Med očeti, ki so bili v pripustu, in očeti v osemenjevanju ni bilo statistično značilnih razlik v pravilnosti porekla potomk. Pri uvoženih plemenskih bikih je bilo 4,391 manj neujemanj s potomkami v primerjavi z domačimi biki. STRUCTURE analiza je pojasnila genetsko strukturo populacije 1474 teličk s predpostavko treh skupin, ki ustrezajo trem pasmam (črno-bela, lisasta in rjava), genetski ustroj križank lisaste pasme z RH in MB je ustrezal lisasti pasmi z manjšim deležem črno-bele pasme. Glavne pasme govedi (rjava, lisasta in črno-bela) v Sloveniji so se med seboj genetsko razlikovale ($F_{ST}=0,0756-0,0953$). Z računalniškim programom GeneClass2 smo na podlagi genotipov z neposrednim določitvenim testom več kot 98,2 % čistopasemskih teličk uvrstili v pasmo, ki ustreza rodovniku in fenotipu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 575:636.2(497.4)(043)=1.63.6
CX cattle/breeds/pedigree/parentage/assignment test/molecular genetics/microsatellites/
AU OPARA, Andreja
AA DOVČ, Peter (mentor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate study of Biological and
Biotechnical sciences, Field: Genetics
PY 2016
TI PEDIGREE TESTING AND ASSIGNMENT TEST IN THREE MAIN CATTLE
BREEDS IN SLOVENIA
DT M. Sc. THESIS
NO VIII, 59 p., 14 tab., 8 fig., 53 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB This study aimed to determine the share of discrepancies in pedigree data, using microsatellite markers, and assign each individual to one of the three main cattle breeds in Slovenia (Holstein, Brown, and Simmental). The study population was a sample of randomly selected heifers in the control of pedigree and production. Pedigree data of 3,404 randomly selected heifers was collected as a part of the joined key breeding programme for cattle in Slovenia. Hair samples of heifers and their mothers were collected, and DNA was isolated from hair follicles. Sire DNA was isolated from hair and semen samples acquired from the semen collection centres. Parental verification was performed using of a set of 12 microsatellite markers. The STRUCTURE program was used to determine the genetic structure of the three main cattle breeds and the upgraded Simmental breed. The GeneClass program was used to perform the assignment test. Analysis of factors influencing pedigree errors was performed using the logistic regression model with the LOGISTIC procedure in the statistical package SAS/STAT. We found that the proportion of mismatches, which was largest in Simmental (16.7 %), decreased by a factor of 0.704 over the years. Compared to the Brown breed, in 2010, Simmental had 6.854x higher chance for pedigree error, whereas, after 2012, there was no statistically significant difference in the proportion of pedigree errors among different breeds and crosses. As expected, the share of discrepancies was higher for paternity than maternity data. There were no significant differences in pedigree errors between sires used for natural service and sires used for artificial insemination. Compared to domestic bulls, imported breeding bulls had 4,391 times less mismatches with their progeny. Additionally, the STRUCTURE analysis revealed the genetic structure of a sample of 1,474 heifers by specifying three groups that correspond to Holstein, Simmental, and Brown breeds. The genetic makeup of the upgraded Simmental population corresponded to the Simmental breed with a smaller proportion corresponding to the Holstein breed. The analysis identified the three main breeds of cattle in Slovenia as genetically differentiated ($F_{ST}=0.0756-0.0953$). In the assignment test, more than 98.2 % of purebred heifers were assigned to a breed that is in concordance with the pedigree and phenotypic data.

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|---|------|
| Ključna dokumentacijska informacija (KDI) | III |
| Key Words Documentation (KWD) | IV |
| Kazalo vsebine | V |
| Kazalo preglednic | VII |
| Kazalo slik | VIII |
| Okrajšave in simboli | IX |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | UVOD | 1 |
| 1.1 | NAMEN NAŠE RAZISKAVE | 2 |
| 1.2 | RAZISKOVALNE HIPOTEZE | 3 |
| 2 | PREGLED OBJAV | 4 |
| 2.1 | GENETSKI OZNAČEVALCI | 4 |
| 2.1.1 | Mikrosateliti | 4 |
| 2.1.2 | Stopnja neujemanj v poreklih v različnih populacijah | 6 |
| 2.2 | PREVERJANJE POREKLA PRI GOVEDU V SLOVENIJI | 7 |
| 2.3 | GENETSKA PESTROST IN UPORABA DOLOČITVENIH TESTOV | 9 |
| 3 | MATERIAL IN METODE | 11 |
| 3.1 | POSKUSNA POPULACIJA | 11 |
| 3.1.1 | Število živali za preverjanje starševstva | 13 |
| 3.1.2 | Število živali za populacijske analize | 14 |
| 3.2 | POSTOPKI V LABORATORIJU | 14 |
| 3.2.1 | Izolacija DNA in PCR | 14 |
| 3.2.2 | Genotipizacija | 17 |
| 3.3 | OBDELAVA PODATKOV | 21 |
| 3.3.1 | Populacijska analiza in verjetnost izključitve | 21 |
| 3.3.2 | Statistična obdelava podatkov o pravilnosti porekla | 22 |
| 3.3.3 | Genetska struktura populacije | 24 |
| 3.3.4 | Uporaba določitvenega testa | 24 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4 | REZULTATI | 25 |
| 4.1 | LASTNOSTI OZNAČEVALCEV V POPULACIJI IN VERJETNOST IZKLJUČITVE STARŠEV | 25 |
| 4.2 | DELEŽ NEUJEMANJ V POREKLIH | 27 |
| 4.2.1 | Delež neujemanj v poreklih po letih in pasmah | 27 |
| 4.2.2 | Delež neujemanj v poreklu glede na starša | 32 |
| 4.2.3 | Delež neujemanj v poreklu glede na izvor in način uporabe bika | 34 |
| 4.3 | POPULACIJSKA ANALIZA | 36 |
| 4.4 | GENETSKA STRUKTURA POPULACIJE GOVEDA V SLOVENIJI | 37 |
| 4.5 | DOLOČITVENI TEST | 40 |
| 5 | RAZPRAVA | 42 |
| 5.1 | NEUJEMANJA V POREKLIH | 42 |
| 5.1.1 | Delež neujemanj v poreklih v Sloveniji v letih 2010–2014 | 42 |
| 5.1.2 | Delež neujemanj v poreklih v Sloveniji v primerjavi s tujimi viri | 44 |
| 5.1.3 | Vzroki za velik delež neujemanj pri lisasti pasmi | 45 |
| 5.2 | POPULACIJSKA ANALIZA | 46 |
| 5.3 | DOLOČITVENI TESTI | 47 |
| 5.4 | KAKŠNE MOŽNOSTI NAM PONUJajo REZULTATI GENOTIPIZACIJE Z MIKROSATELITI NA PODROČJU GOVEDOREJE | 48 |
| 5.5 | PRIČAKOVANI PRISPEVEK MAGISTRSKE NALOGE K RAZVOJU GOVEDOREJE | 49 |
| 6 | SKLEPI | 50 |
| 7 | POVZETEK (SUMMARY) | 51 |
| 7.1 | POVZETEK | 51 |
| 7.2 | SUMMARY | 53 |
| | ZAHVALA | |

KAZALO PREGLEDNIC

str.

| | | |
|-----------------|--|----|
| Preglednica 1: | Število očetov in preverjenih očetovstev glede na izvor in način uporabe bika | 12 |
| Preglednica 2: | Število preverjenih poreklov glede na leto prejema vzorca in pasmo potomke | 14 |
| Preglednica 3: | Seznam uporabljenih mikrosatelitnih označevalcev | 16 |
| Preglednica 4: | Lastnosti označevalcev v populaciji potomkov | 26 |
| Preglednica 5: | Delež neujemanj v poreklah glede na pasmo potomke po letih | 28 |
| Preglednica 6: | Regresijski koeficienti za vpliv leta preverjanja porekla na verjetnost ovrženega porekla | 29 |
| Preglednica 7: | Razmerje obetov in 95 % interval zaupanja za delež napak v poreklu po genotipih in letih | 31 |
| Preglednica 8: | Število preverjenih poreklov in delež neujemanj v poreklu glede na starša | 33 |
| Preglednica 9: | Razmerje obetov za ovrženo poreklo glede na izid preverjanja | 34 |
| Preglednica 10: | Število preverjenih očetovstev in delež neujemanj v poreklu glede na izvor in način uporabe očeta | 35 |
| Preglednica 11: | Razmerje obetov in 95 % interval zaupanja za delež napak v poreklu glede na izvor in način uporabe bika | 35 |
| Preglednica 12: | Vrednost parnih primerjav med pasmami/križanji na osnovi dvanajstih mikrosatelitnih označevalcev (nad diagonalo) in statistična značilnost vrednosti FST (pod diagonalo) | 36 |
| Preglednica 13: | Parametri genetske pestrosti na podlagi mikrosatelitnih označevalcev | 37 |
| Preglednica 14: | Rezultati določitvenih testov glede na pristop | 40 |

KAZALO SLIK

str.

| | | |
|----------|---|----|
| Slika 1: | Vzorci dlake z vidnimi dlačnimi mešički | 13 |
| Slika 2: | Prikaz potrebnega materiala v laboratoriju | 15 |
| Slika 3: | Izpis odčitavanja dolžin mikrosatelitnih označevalcev pri živali z laboratorijsko oznako 150811-43 | 17 |
| Slika 4: | Elektroferogram genetskega profila dveh osebkov (teličke in krave) z uporabo komercialnega kita Bovine Genotypes™ Panel 1.2 | 18 |
| Slika 5: | Prikaz spletne aplikacije za preverjanje porekla | 19 |
| Slika 6: | Ocene verjetnosti s standardnimi napakami za ovrženo poreklo glede na genotip in leto preverjanja porekla | 30 |
| Slika 7: | Graf ΔK vrednosti pri posameznih K vrednostih po metodi, ki so jo opisali Evanno in sod. (2005), določa najverjetnejši $K=3$ | 38 |
| Slika 8: | Ocenjena struktura populacije naključno izbranih teličk, kot izhaja iz programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) na podlagi podatkov mikrosatelitnih označevalcev | 39 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|-----------------|---|
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| F _{IS} | koeficient parjenja v sorodstvu |
| F _{ST} | fiksacijski indeks |
| H _E | pričakovana heterozigotnost v populaciji (<i>ang. expected heterozygosity</i>) |
| H _O | opažena heterozigotnost (<i>ang. observed heterozygosity</i>) |
| HWE | Hardy-Weinbergovo ravnotežje (<i>ang. Hardy Weinberg Equilibrium</i>) |
| ISAG | mednarodno združenje za živalsko genetiko (<i>ang. International Society for Animal Genetics</i>) |
| K | klaster (<i>ang. cluster</i>) |
| MB | montbeliard |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo (<i>ang. Polymerase Chain Reaction</i>) |
| RH | rdeči holštajn |
| SNP | polimorfizem posameznega nukleotida (<i>ang. Single Nucleotide Polymorphisms</i>) |

1 UVOD

Preverjanje in potrjevanje porekla je zelo pomembna naloga rejskega programa pri vseh pasmah goveda. V osnovi ločimo dve ravni preverjanja porekla (Pravilnik ..., 2003). Osnovno preverjanje in potrjevanje porekla se vrši pri govedu, ki je v kontroli porekla, in temelji na pregledu podatkov zootehniške dokumentacije in pregledu zunanjosti. Pri govedu je dodatno preverjanje porekla z uporabo molekularnogenetskih označevalcev posebej pomembno zaradi ekonomske vrednosti plemenskih živali in načina testiranja živali, kjer lastnosti bikov ocenujemo na podlagi velikega števila potomk (preizkus potomcev). Napake v rodovniku vodijo torej do napak pri oceni genetskih parametrov in posledično do napak pri napovedi plemenskih vrednosti (Banos in sod., 2001; Baron in sod., 2002; Visscher in sod., 2002). V svoji simulacijski študiji sta Israel in Weller (2000) ocenila, da v populaciji, ki ima 10 % neujemanj v podatkih o poreklu, izgubimo 4,3 % genetskega napredka pri lastnostih mlečnosti. Z večjim deležem napak v poreklu živali se poveča tudi pristranost (*ang. bias*) napovedi, negativna posledica pa je lahko parjenje v ožjem sorodstvu (Cassell, 1999). Dodatno preverjanje porekla je v Sloveniji obvezno za čistopasemske plemenjake in plemenski material (seme, zarodke, jajčne celice), ki nastopa na trgu in se jih uporablja za oplojevanje krav in telic v skladu s potrjenim rejskim programom (Perpar in sod., 2015).

Pri preverjanju starševstva s pomočjo mikrosatelitnih označevalcev pri genotipizaciji upoštevamo, da potomec podeduje dva alela, enega po očetovi in drugega po materini strani. Če pri posameznem osebku združeno obravnavamo genotipe na več lokusih, dobimo sestavljen genotip, ki predstavlja molekularni opis osebka na izbranih lokusih. S primerjanjem sestavljenih genotipov osebkov, ki so domnevno sorodstveno povezani, lahko sorodstvene zveze ovržemo in posledično lahko sklepamo, da so predlagane sorodstvene zveze pravilne, pričakovana verjetnost pa se ob uporabi velikega števila označevalcev približa 100 %. Z uporabo velikega števila mikrosatelitov (12 in več) se zelo zmanjša verjetnost, da bi imela dva osebka po naključju enak sestavljen genotip. Verjetnost izključitve predstavlja verjetnost, da bomo ovrgli napačnega starša, in jo izračunamo na podlagi frekvenc označevalskih alelov. Verjetnost izključitve je torej mera učinkovitosti

preverjanja starševstva in predstavlja verjetnost, da odkrijemo neskladja (Dodds in sod., 1996).

Določitveni testi (*ang. assignment tests*) uvrstijo posamezno žival v določeno populacijo, pasmo ali vrsto na podlagi genotipov. Za uspešen test je potrebna predhodna populacijska študija genetske raznolikosti na zadostnem številu polimorfnih označevalcev. Na podlagi teh informacij lahko s starševsko analizo in z določitvenim testom preverjamo poreklo živali ali živalskega proizvoda. Takšno sledenje do posamezne živali ali določitev pasme v mešanih proizvodih (Shackell in sod., 2001; Dalvit in sod., 2008b) je pomembno predvsem zaradi povečanega povpraševanja po varni hrani.

1.1 NAMEN NAŠE RAZISKAVE

Namen naše raziskave je:

- predstaviti sistem za preverjanje porekla pri govedu, ki temelji na 12 mikrosatelitnih označevalcih, ki smo ga vzpostavili na Kmetijskem inštitutu Slovenije v letu 2010,
- določiti delež neujemanj na podlagi naključno izbrane populacije teličk v kontroli porekla in prieje v Sloveniji in opredeliti rezultate glede na leto prejema vzorca in pasmo,
- ugotoviti vzroke za neujemanja v poreklih in jih podrobnejše analizirati glede na neujemanje s posameznim staršem (oče, mati, oba starša hkrati), glede na izvor bika (domač, tuj) in glede na način rabe bika (osemenjevanje, pripust),
- opredeliti lastnosti izbranih mikrosatelitnih označevalcev na populaciji goveda v Sloveniji in izračunati verjetnost izključitve posameznega starša in obeh staršev,
- presoditi primernost uporabe računalniških programov STRUCTURE (Pritchard in sod., 2000) in GeneClass2 (Piry in sod., 2004) za določanje strukture in pasemske pripadnosti.

1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

- A) V populaciji goveda v kontroli porekla in prieje je v Sloveniji skupni delež neujemanj podatkov o poreklu (oče, mati, oba starša) med 10 % in 15 %.
- B) Največji odstotek neujemanj je v podatkih o poreklu teličk lisaste pasme, med teličkami rjave in črno-bele pasme ni razlik v skupnem deležu neujemanj.
- C) Podatki o očetu so bili pogosteje napačni kot podatki o materi.
- D) Očetje v osemenjevanju imajo manj neujemanj porekla s potomkami kot očetje v pripustu.
- E) Ocenjena struktura populacije naključno izbranih teličk, ki izhaja iz analize s programom STRUCTURE (Pritchard in sod., 2000) na podlagi podatkov izbranega niza mikrosatelitnih označevalcev, sovpada s pasemske strukturo ($K=3$).
- F) S programom GeneClass2 (Piry in sod., 2004) lahko z najmanj 95 % uspešnostjo določimo pasmo čistopasemskih teličk na podlagi podatkov izbranega niza mikrosatelitnih označevalcev.

2 PREGLED OBJAV

Za razumevanje rezultatov magistrske naloge so v pregledu objav razloženi uporabljeni pojmi ter navedene možnosti uporabe mikrosatelitov. Opisan je način preverjanja porekla pri govedu v Sloveniji, sledi pregled objav o deležu neujemanj v poreklah goveda in genetskih parametrov v različnih populacijah.

2.1 GENETSKI OZNAČEVALCI

Individualnost osebka lahko prikažemo na ravni deoksiribonukleinske kisline (DNA) s pomočjo različnih molekularnih tehnik, ki nam omogočajo odkrivanje genetskih razlik med osebki. Genetski označevalci (*ang. genetic marker*) je fenotipski, biokemijski ali DNA polimorfizem, ki ga uporabljamo za genetski opis osebka ali populacije. Pri preiskavi DNA (na primer pri iskanju nekega gena) je to navadno krajše polimorfno zaporedje nukleotidov (DNA alel), ki se zaradi bližine preiskovane DNA (iskan gen) z njo vezano deduje in jo s tem »označuje«. Polimorfnost pomeni, da so aleli na določenem lokusu med seboj različni in lahko nastopajo v homo- in heterozigotnih kombinacijah. Označevalci, ki zaznavajo genetsko variabilnost na ravni DNA, so številni in posejani po celotnem genomu. Ker za njihovo detekcijo ne potrebujemo transkripta DNA, lahko z njimi pregledamo celoten genom, vključno z nekodogenimi regijami (Dovč, 1998). V naši raziskavi smo uporabljali mikrosatelitne molekularnogenetske označevalce (mikrosatelite), ki imajo visoko stopnjo polimorfnosti.

2.1.1 Mikrosateliti

Mikrosateliti so sestavljeni iz tandemskih ponovitev kratkega, dva do pet baznih parov dolgega nukleotidnega motiva. Različno število ponovitev teh zaporedij na istem lokusu povzroča variabilnost med aleli. Za mikrosatelite je značilna visoka variabilnost v številu ponovitev osnovnega motiva, ki je posledica pogostih mutacij (10^{-3} do 10^{-5} mutacij na lokus na generacijo). Največjo stopnjo mutacij imajo dinukleotidni mikrosateliti, sledijo tri- in tetranukleotidni. Pogoste mutacije so posledica večjega števila napak pri

podvojevanju, saj polimerazni kompleks zaradi velikega števila ponovitev lahko zdrsne pri podvojevanju DNA (*ang. DNA slippage*), pri čemer nastane zanka, ki običajno povzroči podaljšanje dolžine mikrosatelita. Stopnja zdrsa je odvisna od narave ponavljačega se motiva in od njegove dolžine. S citozinom in gvaninom bogati in krajši mikrosateliti imajo manjšo stopnjo zdrsov. Stopnja mutacij je alelno specifična, zato nastajajo na različnih lokusih različni aleli (Goldstein in Schlötterer, 1999). Na vsaki strani mikrosatelita se nahajajo bočne regije, to so neponavljača zaporedja DNA, ki nam služijo za specifično prileganje začetnih oligonukleotidov, da lahko mikrosatelit pomnožimo v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Mikrosateliti se praviloma pojavljajo v nekodirajočih regijah DNA, čeprav je pri človeku znanih nekaj genetskih obolenj, ki jih povezujemo z mikrosatelitskimi regijami v kodirajočih regijah DNA. V populaciji lahko na enem samem lokusu obstaja veliko alelov, pri čemer ima vsak alel svojo dolžino (glede na število ponovitev osnovnega motiva). Osebek, ki je homozigoten za lokus, ima na obeh kromosomih enako število ponovitev, medtem ko ima heterozigotni osebek različno število ponovitev osnovnega motiva. Standardizacija pogojev PCR, nizka cena sinteze začetnih oligonukleotidov in avtomatizacija odčitavanja rezultatov so v preteklosti omogočili široko uporabo tega tipa označevalcev v genetskih študijah (Griffiths in sod., 2004).

Uporaba DNA označevalcev, sprva predvsem mikrosatelitov, za preverjanje starševstva je v svetu uveljavljena metoda, ki je hitra in enostavna ter zahteva relativno majhno število označevalcev za visoko raven zanesljivosti. Mednarodna organizacija ICAR (*ang. International Committee for Animal Recording*) priznava molekularnogenetski metodi z uporabo mikrosatelitskih označevalcev in polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP) kot standardni metodi za določanje starševstva pri govedu (ICAR..., 2015).

Pri odčitavanju genotipa (števila baznih parov) posameznega mikrosatelitnega označevalca upoštevamo, da potomec podeduje dva alela, enega po očetovi in drugega po materini strani. Če pri posameznem osebku združeno obravnavamo genotipe na več lokusih, dobimo sestavljen genotip, ki predstavlja molekularni opis osebka na izbranih lokusih. S primerjanjem sestavljenih genotipov osebkov, ki so domnevno sorodstveno povezani, lahko napačne domneve o sorodstvenih zvezah ovržemo. V primeru, da jih ne moremo ovreči, privzamemo, da veljajo, verjetnost, da se motimo, pa zmanjšamo z uporabo dovolj

velikega števila označevalcev. To verjetnost lahko ocenimo kot verjetnost izključitve napačnega starša (Kavar in Dovč, 1999). S kombinacijo več visoko polimorfnih lokusov lahko dobimo specifičen genotip za vsako žival, razen za enojajčne dvojčke ali visoko inbridirane linije (Kavar, 2001). Na osnovi kombinacije označevalcev za vsako žival lahko določimo tudi ustrezni par staršev, če ta ni znan. Ker je razmnoževanje goveda načrtovano in nadzorovano, uporabljamo starševsko analizo predvsem za kontrolo pravilnosti podatkov v rodovnikih (Žan Lotrič in sod., 2010).

Dovč (1994) je v slovenski populaciji goveda rjave pasme prvič objavil izračun verjetnosti izključitve starša na osnovi enajstih mikrosatelitnih označevalcev in ugotovil, da kombinirana verjetnost izključitve že na osnovi petih lokusov doseže 98,75 % verjetnost za izključitev napačnega starša v populaciji domačih živali.

2.1.2 Stopnja neujemanj v poreklih v različnih populacijah

V populaciji mlečnih pasem govedi v Združenem Kraljestvu so Visscher in sod. (2002) ugotovili 10 % neujemanj v poreklu glede na rodovniške podatke. Pri črno-beli pasmi so bili deleži neujemanj v poreklih: 11,7 % v Izraelu (Weller in sod., 2004), 10,73 % na Češkem (Rehout in sod., 2006), 4,7 %, v Turčiji (Ozkan in sod., 2009), od 12 % do 15 % na Novi Zelandiji (Spelman, 2002; cit. po Carolino in sod., 2009) in 35 % v Iranu (Hashemi in sod., 2013).

O deležu neujemanj pri drugih pasmah je opravljenih manj raziskav, vendar je pričakovani delež neujemanj pri mesnih pasmah večji, ker se osemenjevanje v teh čredah uporablja v manjši meri (Carolino in sod., 2009). Baron in sod. (2002) poročajo o 36 % neujemanj porekel pri brazilskem govedu pasme gir. Carolino in sod. (2009) pa so pri mesnih pasmah na Portugalskem (šarole, limuzin in pasma preta) ocenili delež neujemanj z obema staršema hkrati (2 %), z očetom (7 %) in z materjo (14 %). Ugotavlja, da je velik skupni delež neujemanj v njihovih čredah (23,6 %) predvsem zaradi neustreznega evidentiranja telitev.

2.2 PREVERJANJE POREKLA PRI GOVEDU V SLOVENIJI

Samo preverjanje porekla razdelimo v dve stopnji, osnovno in dodatno preverjanje. Osnovno preverjanje porekla se izvaja pri vseh živalih. V okviru osnovnega preverjanja se ob označitvi teleta na podlagi fenotipskih lastnosti živali preveri pasmo matere in teleta. Poleg tega se preveri podatke o osemenitvi oziroma pripustu matere in ujemanje teh podatkov s podatki o telitvi. Poreklo se prizna le, če podatki ustrezajo logičnim mejam dolžine brejosti za pasmo (Perpar in sod., 2015).

Za dodatno preverjanje porekla se uporabljo molekularnogenetske metode z uporabo mikrosatelitov in v zadnjih letih tudi označevalcev SNP. Dodatno preverjanje porekla se v Sloveniji uporablja za čistopasemske plemenjake in plemenski material (seme, zarodke, jajčne celice), ki nastopa na trgu in se porablja za oplojevanje krav in telic v skladu s potrjenim rejskim programom. Poleg tega ga uporabljamo tudi v primeru suma nepravilnosti podatkov o poreklu živali. V posebnih primerih se dodatno preverjanje lahko uporablja kot način določanja enega ali obeh staršev, uporablja pa se tudi za naključno preverjanje rodovnikov (Perpar in sod., 2015).

Glavnih razlogov, zaradi katerih v poreklih prihaja do napak, je več:

- napaka pri označevanju doz v osemenjevalnem centru ali odvzem semena napačnemu biku,
- osemenjevanje z napačno slamico ali napačno prepisani podatki o plemenskem biku pri osemenitvi,
- nenadzorovan pripust (nenamerno),
- uporaba domačega bika (namerno),
- prisotnost več kot enega bika v čredi (rejec ne ve, kateri bik je oče) – predvsem pri mesnih in kombiniranih rejah,
- zamenjava telet ob rojstvu (tele pripisano napačni kravi),
- napaka pri prepisovanju oziroma sporočanju podatka.

V okviru preverjanja porekla pri govedu z uporabo molekularnogenetskih metod se Kmetijski inštitut Slovenije udeležuje primerjalnega testa, ki ga organizira mednarodno

združenje za živalsko genetiko (ISAG). Namen testa je omogočiti laboratorijem, da vzdržujejo visok standard kakovosti in primerljivosti analiz in da sprejmejo mednarodni sporazum o nomenklaturi ter pravila za preverjanje sorodstva. Rezultat testa je certifikat o mednarodni primerljivosti in zanesljivosti. Primerljivost je ključna za preverjanje porekla uvoženih živali ali njihovih potomcev, zato smo se v test za govedo prvič vključili leta 2009–2010. Potrdilo o udeležbi na primerjalnem testu vključuje rezultate za absolutno in relativno točnost genotipizacije z mikrosateliti v laboratoriju (Cattle..., 2010). Skozi vsa leta smo bili uspešni in se uvrščali v najvišji, prvi razred.

Pri cikasti pasmi je preverjanje in potrjevanje porekla pomembno zaradi večdesetletne odsotnosti dela na selekciji avtohtone cikaste pasme in je zato pri starejših živalih precej manjkajočih podatkov o poreklu. Le manjša skupina živali ima popolno poreklo (znani dve generaciji prednikov), tako da ima večina živali le delno poreklo (poreklo ene generacije prednikov ali poreklo le enega od staršev). Preverjanje in potrjevanje porekla je osnova za vodenje izvirne rodovniške knjige za cikasto govedo in za uspešno preprečevanje parjenja v sorodstvu (Žan Lotrič in sod., 2010).

Na podlagi razvojne naloge v govedoreji je rejska organizacija PRO CIKA (Združenje rejcev avtohtonega cikastega goveda v Sloveniji) 13. 3. 2015 podala predlog spremembe rejskega programa za cikasto pasmo (Klinkon, 2015), po katerem bi vsi plemenski biki cikaste pasme, ki so vključeni v osemenjevanje, morali imeti tudi določeno (ocenjeno) pasemske sestavo na osnovi večjega števila označevalcev SNP (Illumina BovineSNP50 BeadChip). Za plemenske bike v pripustu bi bila ocenjena pasemska sestava na osnovi genoma zelo zaželena. Plemenski biki, ki tega podatka ne bi imeli, ne bi smeli biti vključeni v osemenjevanje. V osemenjevanje bi lahko bili vključeni le plemenski biki, ki bi imeli na podlagi pasemske sestave genoma več kot 60 % cikaste pasme, manj kot 7 % rdeče holštajn pasme in manj kot 3 % tujerodnih pasem. V skupnem obsegu do 40 % je dovoljena prisotnost genoma naslednjih pasem: pincgavska, lisasta, rjava. V katalogu bikov je v takih primerih treba zapisati, da »Plemenski bik pripada cikasti pasmi na podlagi določene – ocnjene pasemske sestave na podlagi genotipizacije z večjim številom genetskih označevalcev SNP« (Klinkon, 2015).

2.3 GENETSKA PESTROST IN UPORABA DOLOČITVENIH TESTOV

Samo genetsko pestrost lahko opišemo na več načinov, večina jih je vezana na stopnjo heterozigotnosti, torej na delež označevalcev, pri katerih sta dve kopiji (ena od vsakega starša) različni. Vrednost te stopnje je lahko med 0 in 1, čim višja je, bolj genetsko pestra je pasma (Frankham, 2010). F-statistika (Wright, 1950) ocenjuje odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnotežja in tako ocenjuje ravnotežje genotipov v populaciji. S primerjavo opažene in pričakovane stopnje heterozigotnosti lahko določimo, ali je populacija v ravnotežju. Negativna F_{IS} vrednost kaže na to, da je v populaciji opažena heterozigotnost večja od pričakovane, pozitivna vrednost pa, da je opažena heterozigotnost manjša od pričakovane. Genetsko pestrost zmanjšuje parjenje v sorodstvu, povečuje pa jo križanje oziroma vnos tujih genov. Genetsko razdaljo med pasmami definira parameter F_{ST} (Weir in Cockerham, 1984), ki nam pove, kakšen je delež opažene variance v frekvenci alelov med podpopulacijami glede na varianco v celotni populaciji.

Simčič in sod. (2008) so na nizu devetih mikrosatelitnih označevalcev genetsko okarakterizirali slovensko avtohtono pasmo goveda, ciko in hrvaško avtohtono pasmo bušo. V populacijski analizi so določili povprečno stopnjo heterozigotnosti, ki je bila manjša pri ciki (0,7403) kot pri buši (0,7775), genetska razdalja med pasmama pa je znašala 0,065.

Zaradi velikega števila lokalnih pasem domačih živali, od katerih mnogim grozi izumrtje, se je v mednarodnem okviru pojavila potreba po čim bolj realni oceni genetskih razdalj med posameznimi pasmami, kar bi omogočilo identifikacijo pasem, ki največ prispevajo h genetski variabilnosti vrst in je njihovo ohranjanje sofinancirano iz mednarodnih virov (Kavar in Dovč, 1999). Da bi bili rezultati teh raziskav med seboj primerljivi, je bilo nujno izbrati standardne nize označevalcev za oceno genetskih distanc. Ti nizi so pri govedu priporočeni s strani FAO (*ang. Food and Agriculture Organization*), mednarodno primerljivost pa s primerjalnimi testi zagotavlja ISAG.

Molekularnogenetski podatki so dober pokazatelj variabilnosti v populacijah, kar nam omogoča zasnovno programov ohranjanja genetske pestrosti v populacijah. Poleg tega lahko

s pomočjo mikrosatelitov na podlagi določitvenih testov izključimo posamezni, ki imajo izvor v referenčnih populacijah (pasmah). Hitrost analiz, ki temelji na PCR, nizka cena sinteze začetnih oligonukleotidov in avtomatizacija odčitavanja rezultatov so vplivali na razvoj metod z uporabo mikrosatelitov v določitvenih testih. Za odločanje, ali preiskovane osebke lahko združimo v skupine na podlagi mikrosatelitov in za določitev števila skupin, ki najbolj ustreza genetskim podatkom, lahko uporabljam Bayesovo metodo grupiranja s programom STRUCTURE (Pritchard in sod., 2000). Grupiranje (*ang. clustering*) je postopek razvrščanja osebkov znotraj populacije v podpopulacije. Za določanje verjetnosti, v kolikšni meri posamezna telička pripada določeni pasmi na podlagi genotipa, so Piry in sod. (2004) razvili računalniški program GeneClass2, ki na podlagi opazovanih frekvenc alel v populaciji posameznim osebkom po različnih metodah določi izvorno skupino oziroma pasmo.

Z analizo s programom STRUCTURE so Simčič in sod. (2013) na podlagi 14 mikrosatelitnih označevalcev prvič umestili cikasto pasmo v skupino 16 srednjeevropskih pasem goveda. Na osnovi rezultatov genotipizacije z označevalci SNP pa so Simčič in sod. (2015) pridobili bolj nepristranske ocene parametrov genetske pestrosti in ocenili delež primesi drugih pasem znotraj populacije cikaste pasme.

Van de Goor in sod. (2011) predlagajo niz 16 mikrosatelitnih označevalcev pri govedu (BM1818, BM1824, BM2113, CSRM60, CSSM66, ETH3, ETH10, ETH225, HAUT27, ILSTS006, INRA023, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126 in TGLA227) za rutinsko forenzične obravnave primerov zaradi enostavnosti in praktičnosti tega tipa označevalcev, kar je pri rutinski analizi genomske DNA pomembno dejstvo. ISAG lokusi prvotno niso bili izbrani na podlagi znanstvenih študij oziroma njihove informativnosti, zato je objavljanje teh podatkov za vse pasme zelo pomembno. Informativnost genetskih označevalcev v določeni populaciji vpliva na uspešnost določitvenega testa. Uspešnost določitvenega testa pa je odvisna tudi od genetskih razdalj med proučevanimi pasmami, te pa označuje indeks F_{ST} . Uporaba določitvenega testa je smiselna predvsem pri pasmah, ki se genetsko dovolj razlikujejo za doseganje večje zanesljivosti določitvenega testa (van de Goor in sod., 2011).

3 MATERIAL IN METODE

Podatke o preverjanju in potrjevanju porekla pri govedu smo zbrali v okviru izvajanja skupnega temeljnega rejskega programa za govedo v Sloveniji. Informacije shranjujemo v Centralni podatkovni zbirki Govedo (Logar in sod., 2005), ki jo vzdržujejo na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Z nalogo »naključno preverjanje porekla z uporabo molekularnogenetskih metod pri govedu« smo pričeli leta 2010 (Logar in Opara, 2011). Starševstvo smo letno preverili pri 1 % (830 teličk) potomk krav v kontroli porekla in priteče z namenom kontrole pravilnosti podatkov v rodovnikih.

3.1 POSKUSNA POPULACIJA

Za potrebe naključnega preverjanja porekla smo iz slovenske populacije goveda, ki je v kontroli priteče, med 1. januarjem 2010 in 1. januarjem 2015 s pomočjo kontrolorjev na zavodih Kmetijsko gozdarske zbornice Slovenije (KGZS) zbrali vzorce (dlake z dlačnimi mešički) teličk in njihovih mater. V letih 2010 in 2011 smo teleta s proceduro, ki generira naključna števila v SQL jeziku (*ang. Structured Query Language*), naključno izbrali iz populacije v kontroli porekla in priteče. V letih 2012, 2013 in 2014 pa smo se v naključnem izboru bolj osredotočili na reje bikovskih mater, reje, kjer rejci osemenjujejo sami, in reje s haremškim pripustom. V izbor smo skušali zajeti tudi dvojne osemenitve z različnimi biki. Neprimerni vzorci in vzorci potomk, kjer vzorca matere ni bilo mogoče dobiti, niso bili vključeni v analizo.

Preglednica 1: Število očetov in preverjenih očetovstev glede na izvor in način uporabe bika

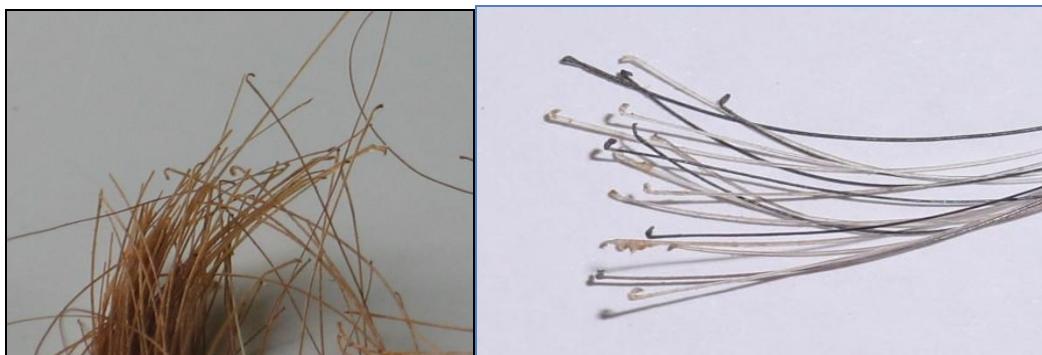
Table 1: Number of sires and paternities verified depending on the origin and use of sire

| Biki glede na izvor in način uporabe | Oznaka na prvem mestu republiške številke bika | Število vseh bikov | Število preverjanj porekel teličk |
|--------------------------------------|--|--------------------|-----------------------------------|
| Domači biki | vse razen 7 in 4 | 406 | 2985 |
| Tuji biki | 7, 4 | 184 | 419 |
| Skupaj | | 590 | 3404 |
| Za pripust* | 8 | 35 | 55 |
| Za osemenjevanje | vse razen 8 | 546 | 3341 |
| Skupaj | | 581 | 3396 |

*V izračun niso vštetili biki cikaste pasme in določeni biki mesnih pasem, ki so se uporabljali za pripust in osemenjevanje hkrati

*Cika bulls and certain meat breeds were not included in the calculation, because they have been used for artificial insemination and for natural service at the same time

Biološki material bikov (očetov) je bila lahko dlaka z dlačnimi mešički (slika 1) ali seme, pakirano v slamice, ki so nam ga zagotovili na osemenjevalnih centrih (Osemenjevalni center Preska in Osemenjevalni center Ptuj). Seme 184 tujih bikov (preglednica 1) pri 419 preverjenih poreklih je bilo večinoma že analizirano in v teh primerih smo uporabili znane podatke. Tuji plemenski biki imajo na prvem mestu republiške številke oznako 7 ali 4. Domače plemenske bike smo analizirali sami (406 bikov in 2985 preverjenih poreklov). Glede na način uporabe bikov je bilo 35 odbranih plemenskih bikov za pripust (biki imajo v republiški številki na prvem mestu 8). Preostali biki se uporabljajo izključno za osemenjevanje. Izjema so biki cikaste pasme in določeni biki mesnih pasem, ki se uporabljajo za pripust in osemenjevanje hkrati in zato v tem izračunu niso bili upoštevani. Preostalih 546 bikov je bilo v osemenjevanju (3341 preverjenih poreklov).



Slika 1: Vzorci dlake z vidnimi dlačnimi mešički

Figure 1: Hair samples with visible hair roots

3.1.1 Število živali za preverjanje starševstva

V letih 2010–2014 smo preverili 3404 porekel (preglednica 2), najmanj 543 in največ 754 v posameznem letu, pri čemer so imele vse teličke oba znana in genotipizirana starša. Leto preverjanja starševstva smo vezali na leto prejema vzorca, ker so kontrolorji vzorce poslali tudi z daljšim časovnim zamikom. Največ porekel (1376) smo preverili pri lisasti pasmi, ki je v slovenski populaciji goveda tudi najbolj zastopana (Sadar in sod., 2015). Sledila ji je črno-bela pasma (1165 preverjanj), ki je tudi po zastopanosti druga najpogostejša pasma v Sloveniji. Rjava pasma in križanci lisaste pasme s pasmo rdeči holštajn (RH) in montbeliard (MB) so v populaciji goveda v Sloveniji približno enako zastopani, kar se odraža tudi v številu preverjanj (414 in 404 preverjenih porekel). Križanke lisaste pasme z RH in MB so teličke, ki imajo v pasemski sestavi poleg lisaste pasme od 14 % do 86 % pasme rdeči holštajn in/ali montbeliard. Nekatere pasme, ki so v Sloveniji redkeje zastopane, so bile prav tako zajete v izbor (rdeči holštajn, montbeliard, limuzin, šarole in cikasta pasma), vendar v manjšem številu, zato jih prikazujemo združeno kot druge pasme (preglednica 2).

Preglednica 2: Število preverjenih porekla glede na leto prejema vzorca in pasmo potomke

Table 2: Number of pedigree verifications depending on the year of sample reception and offspring breed

| Pasma/križanje potomke | Leto prejema vzorcev | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|------|------|------|------|--------|
| | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | Skupaj |
| Število preverjenih porekla | | | | | | |
| Lisasta | 244 | 292 | 240 | 288 | 312 | 1376 |
| Križanke lisaste pasme z RH in MB * | 84 | 95 | 68 | 82 | 75 | 404 |
| Črno-bela | 254 | 262 | 180 | 229 | 240 | 1165 |
| Rjava | 84 | 78 | 47 | 92 | 113 | 414 |
| Druge pasme | 11 | 4 | 8 | 8 | 14 | 45 |
| Skupaj | 677 | 731 | 543 | 699 | 754 | 3404 |

* potomke, ki imajo poleg lisaste pasme od 14 % do 86 % pasme rdeči holštajn in/ali montbeliard, ostale pasme (število preverjenih porekla) – rdeči holštajn (21), montbeliard (1), limuzin (8), šarole (5) in cikasta pasma (10)

* descendants, besides having Simmental from 14 % to 86 % of Red Holstein breed and/or Montbeliard, other breeds (number of verified origin) – Red Holstein (21) Montbeliard (1), Limousin (8), Charolais (5) and Cika breed (10)

3.1.2 Število živali za populacijske analize

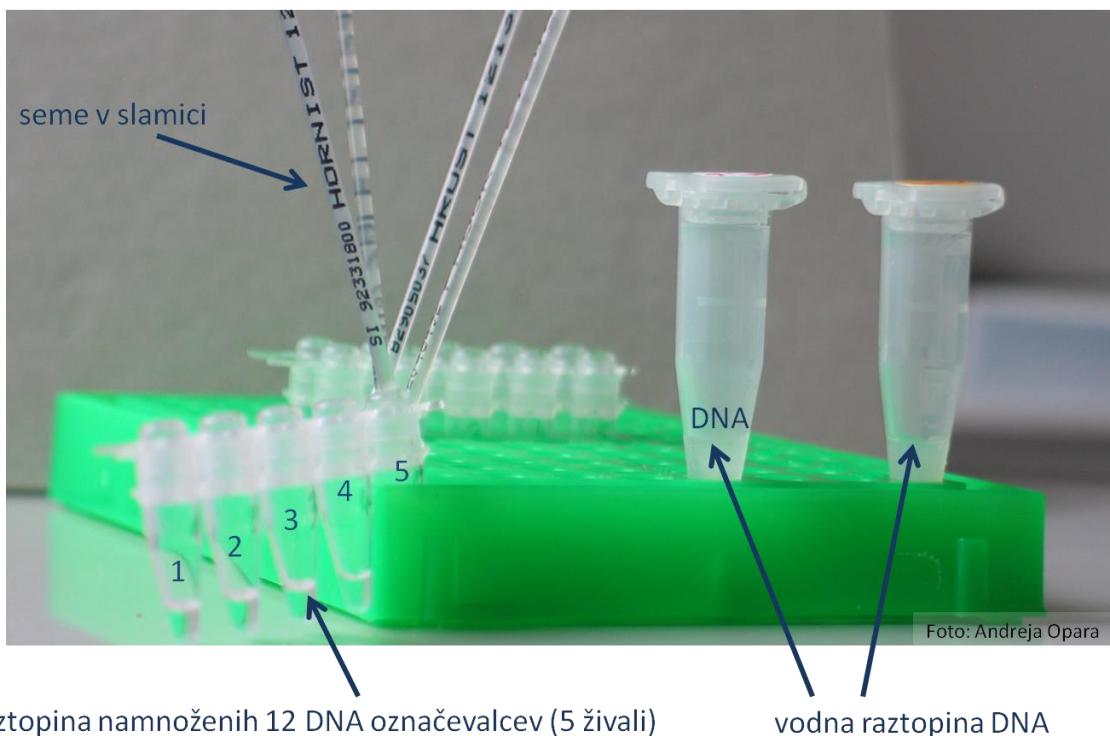
Za izračun osnovnih populacijskih parametrov in za določitev genetske strukture smo uporabili 1474 teličk (potomk), ki so bile naključno izbrane iz kontrolirane populacije goveda v letih 2010 in 2011. Zahtevke za odvzem vzorcev smo periodično pošiljali med 1. 1. 2010 in 31. 12. 2011 in tako smo v populacijsko analizo zajeli vse prispele vzorce z datumom zahtevka v omenjenem obdobju. V izbor smo zajeli potomke treh pasem: 563 črno-bele, 548 lisaste in 168 rjave pasme, preostalih 195 teličk pa so bile križanke lisaste pasme z RH in MB. Drugih pasem v populacijsko analizo nismo vključili zaradi premajhnega števila vzorcev.

3.2 POSTOPKI V LABORATORIJU

3.2.1 Izolacija DNA in PCR

Iz dlačnih mešičkov smo genomsko DNA izolirali s komercialnim kitom NucleoMag 96 za tkiva (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co) na aparaturi MagMax (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) po navodilih proizvajalca. Vzorce DNA iz semena smo izolirali s

komercialnim kitom QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Group, Nemčija) po navodilih proizvajalca.



Slika 2: Prikaz potrebnega materiala v laboratoriju

Figure 2: The necessary material in the laboratory

Uporabili smo dvanajst mikrosatelitnih označevalcev (preglednica 3) SPS115, TGLA122, INRA23, TGLA53, TGLA227, BM1824, ETH10, TGLA126, BM2113, ETH3, ETH225 in BM1818, ki jih priporoča ISAG (Cattle..., 2008) in so vključeni v komercialni kit Bovine Genotypes™ Panel 1.2 (Thermo Scientific). Učinkovita raba fluorescentnih barvil ob upoštevanju pričakovanih dolžin mikrosatelitov omogoča analizo vseh lokusov hkrati. PCR smo izvedli po navodilih proizvajalca. Gre za *in vitro* pomnoževanje DNA. DNA-polimeraza sintetizira komplementarno verigo od mesta na vzorčni DNA, kamor se je vezal začetni oligonukleotid. S ponavljanjem denaturacije dvojne verige DNA molekul, vezave začetnih oligonukleotidov in ciklične sinteze komplementarne verige DNA, ki se nahaja med dvema primerno izbranima začetnima oligonukleotidoma, eksponentno pomnožujemo DNA.

Preglednica 3: Seznam uporabljenih mikrosatelitnih označevalcev

Table 3: List of microsatellite markers used

| Označevalec | Mesto na kromosomu | Struktura motiva | Ponavljač motiv | Avtor/-ji (leto) | Zaporedje začetnih oligonukleotidov (F-smiseln in R-protismiseln) | Dolžina produkta (bazni pari) |
|-------------|--------------------|------------------|---|--------------------------|--|-------------------------------|
| BM1818 | D23S21 | enostavna | (TG) _n | Bishop in sod. (1994) | F: AGCTGGAAATATAACCAAAGG R: AGTGTTCAGGTCCATGC | 253-277 |
| BM1824 | D1S34 | enostavna | (GT) _n | Barendse in sod. (1994) | F: GAGCAAGGTGTTTCCAATC R: CATTCTCCAAC TGCTTCCTTG | 176-188 |
| BM2113 | D2S26 | enostavna | (CA) _n | Sunden in sod. (1993) | F: GCTGCCTCTACCAAATACCC R: CTTCCTGAGAGAAGCAACACC | 124-146 |
| ETH3 | D19S2 | sestavljenā | (GT) _n AC(GT) ₆ | Toldo in sod. (1993) | F: GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG R: ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG | 100-128 |
| ETH10 | D5S3 | enostavna | (AC) _n | Toldo in sod. (1993) | F: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAAC R: CCTCCAGCCCCACTTCTCTTCTC | 206-222 |
| ETH225 | D9S2 | sestavljenā | (TG) ₄ CG(TG)(CA) _n | Steffen in sod. (1993) | F: GATCACCTTGCCACTATTCCT R: ACATGACAGGCCAGTGTACT | 139-157 |
| INRA023 | D3S10 | enostavna | (AC) _n | Vaiman in sod. (1994) | F: GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC R: TAACTACAGGGTGTAGATGAACTC | 201-225 |
| SPS115 | D15 | sestavljenā | (CA) _n TA(CA) ₆ | (Bovine..., 2006) | F: AAAGTGACACAACAGCTCACAG R: AACCGAGTGTCCCTAGTTGGCTGTG | 247-261 |
| TGLA53 | D16S3 | sestavljenā | (TG) ₆ CG(TG) ₄ (TA) _n | Georges in Massey (1992) | F: GCTTCAGAAATAGTTGCATTCA R: ATCTTCACATGATATTACAGCAGA | 151-187 |
| TGLA122 | D21S6 | sestavljenā | (AC) _n (AT) _n | Georges in Massey (1992) | F: AATCACATGGCAAATAAGTACATAC R: CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC | 136-182 |
| TGLA126 | D20S1 | enostavna | (TG) _n | Georges in Massey (1992) | F: CTAATTTAGAATGAGAGAGGGCTTCT R: TTGGTCCTCTATTCTCTGAATATTCC | 111-127 |
| TGLA227 | D18S1 | enostavna | (TG) _n | Georges in Massey (1992) | F: GGAATTCCAATCTGTTAATTGCT R: ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA | 76-104 |

3.2.2 Genotipizacija

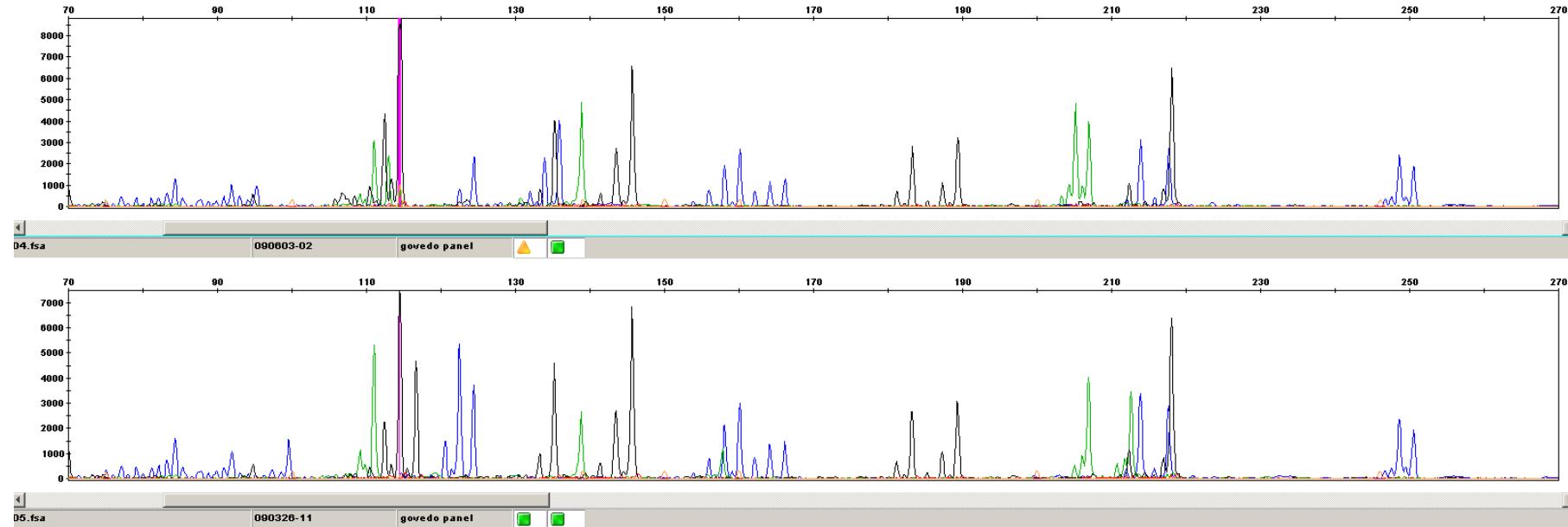
Analizo dolžin produktov PCR smo izvedli z genetskim analizatorjem ABI3130xl. Aleli so bili odčitani glede na ISAG nomenklaturo s pomočjo programske opreme GeneMapper (različica 4.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA). Med odčitavanjem dolžin mikrosatelitov iz elektroferograma smo si pomagali s paneli (*ang. panel*), ki s pomočjo binov (*ang. bin*) omogočajo avtomatsko odčitavanje rezultatov. Bini predstavljajo pričakovane dolžine alelov na posameznem mikrosatelitnem označevalcu.

| Laboratorijska oznaka | ime mikrosatelta | krajši alel | daljši alel |
|-----------------------|------------------|-------------|-------------|
| 150811-43 | 01-BM1824 | 182 | 188 |
| 150811-43 | 02-BM2113 | 137 | 137 |
| 150811-43 | 03-ETH10 | 219 | 219 |
| 150811-43 | 04-ETH225 | 146 | 150 |
| 150811-43 | 05-ETH3 | 125 | 129 |
| 150811-43 | 06-INRA23 | 200 | 208 |
| 150811-43 | 07-SPS115 | 248 | 248 |
| 150811-43 | 08-TGLA122 | 143 | 151 |
| 150811-43 | 09-TGLA126 | 117 | 117 |
| 150811-43 | 10-TGLA227 | 89 | 97 |
| 150811-43 | 11-TGLA53 | 170 | 184 |
| 150811-43 | 12-BM1818 | 266 | 266 |

Slika 3: Izpis odčitavanja dolžin mikrosatelitnih označevalcev pri živali z laboratorijsko oznako 150811-43

Figure 3: Record of microsatellite marker lengths reading in an animal with a laboratory code 150811-43

Vsek osebek tako dobi enoznačen genetski opis, ki ga sestavlja 24 cifer, ki predstavljajo laboratorijsko oznako živali, ime mikrosatelitnega označevalca in dolžino PCR produktov na vsakem od dveh alelov (slika 3). Program GeneMapper nam omogoča izpis v .txt obliki, ki smo ga s pomočjo spletnne aplikacije uvozili v podatkovno zbirkovo Govedo (Logar in sod., 2005), v kateri se hranijo in iz katere so dostopni podatki o genotipu, vezani na posamezno žival. GeneMapper programska oprema nam omogoča grafični in tabelarični prikaz rezultatov. Na elektroferogramu (grafični prikaz) so na x-osi dolžine fragmentov (bazni pari), ki so v razponu od 70 do 270 baznih parov, na y-osi pa relativna količina fragmenta (jakost signala). Bovine Genotypes™ Panel 1.2 (Thermo Scientific) omogoča sočasno preiskovanje 12 mikrosatelitnih označevalcev (slika 4).



Slika 4: Elektroferogram genetskega profila dveh osebkov (teličke in krave) z uporabo komercialnega kita Bovine GenotypesTM Panel 1.2

Figure 4: Electropherogram of genetic profiles for two individuals (heifer and cow) with the use of commercial Bovine GenotypesTM Panel 1.2

Starševstvo smo preverili s programsko opremo, ki smo jo razvili v ta namen v okviru informacijskega sistema Govedo na Kmetijskem inštitutu Slovenije (slika 5). Odstopanja med genotipi in rodovniki smo dodatno preverjali. Možnost, da bi ovrgli prave starše, smo zmanjšali tako, da smo upoštevali možnost mutacij. Poreklo smo ovrgli le, če so bila neujemanja prisotna na več kot enem označevalskem lokusu. V primerih, kjer sta se oba starša hkrati ujemala s potomci, je verjetnost, da gre za naključje, zelo majhna, zato ponovna analiza ni bila smiselna. V primerih, ko ujemanja ni bilo, smo analizo ponovili in tako izključili možnost, da gre za napako v genotipizaciji.

| ID živali | ID ženska | ID moški | Lastnost | ŽV1 | ŽV2 | ŽeV1 | ŽeV2 | MV1 | MV2 | Ž | M | K |
|-------------|-------------|-------------|----------|-----|-----|------|------|-----|-----|---|---|---|
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | BM1818 | 262 | 266 | 262 | 262 | 262 | 266 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | BM1824 | 180 | 182 | 178 | 182 | 180 | 188 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | BM2113 | 127 | 133 | 133 | 137 | 125 | 127 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | ETH10 | 217 | 219 | 219 | 223 | 217 | 217 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | ETH225 | 140 | 150 | 140 | 150 | 144 | 150 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | ETH3 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | INRA23 | 214 | 214 | 198 | 214 | 214 | 214 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | SPS115 | 252 | 252 | 248 | 252 | 248 | 252 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | TGLA122 | 149 | 151 | 151 | 151 | 149 | 149 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | TGLA126 | 115 | 117 | 115 | 117 | 117 | 117 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | TGLA227 | 93 | 93 | 89 | 93 | 81 | 93 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 73209995 | TGLA53 | 154 | 160 | 154 | 168 | 160 | 160 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | BM1818 | 262 | 266 | 262 | 262 | 262 | 268 | 1 | 1 | 0 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | BM1824 | 180 | 182 | 178 | 182 | 188 | 188 | 1 | 0 | 0 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | BM2113 | 127 | 133 | 133 | 137 | 137 | 137 | 1 | 0 | 0 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | ETH10 | 217 | 219 | 219 | 223 | 217 | 223 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | ETH225 | 140 | 150 | 140 | 150 | 140 | 150 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | ETH3 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | INRA23 | 214 | 214 | 198 | 214 | 208 | 210 | 1 | 0 | 0 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | SPS115 | 252 | 252 | 248 | 252 | 248 | 252 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | TGLA122 | 149 | 151 | 151 | 151 | 171 | 181 | 1 | 0 | 0 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | TGLA126 | 115 | 117 | 115 | 117 | 115 | 117 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | TGLA227 | 93 | 93 | 89 | 93 | 91 | 93 | 1 | 1 | 1 |
| SI 44374329 | SI 44089841 | SI 93405498 | TGLA53 | 154 | 160 | 154 | 168 | 170 | 184 | 1 | 0 | 0 |

ŽV1 - alel 1 za testirano žival, ŽV2 - alel 2 za žival, ŽeV1 - alel 1 za mater, ŽeV2 - alel 2 za mater, MV - alel 1 za očeta in MV2 - alel 2 za očeta

Slika 5: Prikaz spletne aplikacije za preverjanje porekla

Figure 5: Web application for pedigree verification

V stolpcih ŽV1, ŽV2, ŽeV1, ŽeV2, MV1 in MV2 (slika 5) so prikazane dolžine mikrosatelitov v enotah baznih parov za potomca (ID živali), za kravo (ID ženska) in za bika (ID moški). V stolpcu Ž je prikazano ujemanje z materjo za vsak mikrosatelitni označevalcev, v stolpcu M ujemanje z očetom in v stolpcu K skupno oziroma končno ujemanje (slika 5). V primeru ujemanja na posameznem mikrosatelitnem označevalcu se izpiše 1, v primeru neujemanja pa 0. Žival SI44374329 se je ujemala z materjo SI44089841 in očetom SI73209995, z drugim možnim očetom SI93405498 pa se ni ujemala. Genotipske podatke hranimo v podatkovni zbirki Govedo in tako zagotavljamo arhiv mikrosatelitnih genotipov. Podatki so vezani na posamezno žival in jih po potrebi povezujemo z ostalimi podatki, ki se hranijo v tej podatkovni zbirki (podatki o lastniku živali, načinu in velikosti reje, osemenitvah, telitvah ...).

3.3 OBDELAVA PODATKOV

3.3.1 Populacijska analiza in verjetnost izključitve

Informacijo o genetski strukturi (izračun opažene stopnje heterozigotnosti in števila alelov) smo pridobili s programom Fstat (Goudet, 1995). Preverili smo, ali so populacije (posamezne pasme) v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Za ugotavljanje ravnotežja znotraj pasme smo uporabili F-statistiko, ki ocenjuje odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnotežja. Panmiksijo (iz grščine: panmyxis – splošno mešanje) smo merili s parametrom F_{IS} (Weir in Cockerham, 1984). Negativna F_{IS} vrednost pomeni, da je v populaciji opažena heterozigotnost večja od pričakovane, pozitivna F_{IS} vrednost pa, da je v populaciji opažena heterozigotnost manjša od pričakovane. Genetske razdalje smo izračunali s parametrom FST (Weir in Cockerham, 1984), ki nam pove, kakšen je delež opažene variance v frekvenci alelov med podpopulacijami glede na varianco v celotni populaciji. FST je prilagojena za majhne in neenako velike populacije ali majhno število populacij (Weir in Cockerham, 1984).

Verjetnost izključitve starša na podlagi posameznega mikrosatelitnega označevalca smo izračunali po enačbi 1 (Jamieson, 1994). Ta enačba se uporablja za izračun verjetnosti izključitve starša, kadar imata oba starša znan genotip:

$$P_j = 1 - 2 \sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^3 + 2 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3 \quad \dots(1)$$

P_j = verjetnost izključitve starša na podlagi posameznega mikrosatelitnega označevalca

n = število alelov

p_i = pogostost i-tega alela

Po enačbi 2 smo izračunali kombinirano verjetnost izključitve starša na podlagi 12 mikrosatelitnih označevalcev:

$$P = 1 - \prod_{j=1}^k (1 - P_j) \quad \dots(2)$$

P = kombinirana verjetnost izključitve

P_j = verjetnost izključitve starša na podlagi posameznega mikrosatelitnega označevalca

k = število označevalcev

Verjetnost izključitve je mera učinkovitosti testiranja starševstva in predstavlja verjetnost, da odkrijemo neskladja. Ta parameter meri možnost detekcije napačnih poreklov. S povečevanjem števila lokusov se povečuje verjetnost izključitve napačnega starša (Dovč, 1994).

3.3.2 Statistična obdelava podatkov o pravilnosti porekla

V obdelavo smo vključili štiri genotipe (G_i) teličk: listasta pasma, črno-bela, rjava ter križanke lisaste pasme z RH in MB. Izvrednotili smo trend spreminjanja razmerja obetov po letih pri proučevanih pasmah in križanjih. Ustreznost modela smo opredelili s Hosmer-Lemeshowim testom skladnosti. Ostalih pasem nismo vključili zaradi premajhnega števila opazovanj. Za razumevanje in uporabo logistične regresije moramo poznati pojme kot so obeti, logit, razmerje obetov in referenčna skupina.

Obeti (*ang. odds*) – število ovrženih poreklov glede na število potrjenih poreklov

Logit – logaritemska transformacija obetov: $L = \ln(\text{odds}) = \ln(p/(1-p)) = \text{logit } P$

Razmerje obetov (*ang. Odds Ratio*) je razmerje med obetom za dogodek pri določenem nivoju glede na obet za dogodek pri drugem nivoju. Referenčna skupina je skupina, s katero primerjamo obete za dogodek glede na obete za dogodek v ostalih skupinah. Pri interpretaciji rezultatov smo s pomočjo razmerij obetov ugotavljal razmerje pogojnih tveganj.

Za analizo vpliva genotipa in leta na razmerje na verjetnost ovrženega porekla smo uporabili naslednji model binarne logistične regresije:

$$\ln(p_{ij} / (1 - p_{ij})) = \mu + G_i + b_i x_{ij} \quad \dots(3)$$

p_{ij} verjetnost ovrženega porekla,

μ srednja vrednost,

G_i vpliv i-tega genotipa (1, 2, 3, 4),

b_i regresijski koeficienti,

x_{ij} vpliv leta preverjanja porekla (1, 2, ..., 5).

Za analizo vpliva načina uporabe bika (osemenjevanje, pripust) na verjetnost ovrženega porekla smo uporabili naslednji model binarne logistične regresije:

$$\ln(p_i / (1 - p_i)) = \mu + N_i \quad \dots(4)$$

- p_i verjetnost ovrženega porekla,
 μ srednja vrednost za lastnost,
 N_i vpliv i-tega načina uporabe bika (osemenjevanje, pripust).

V obdelavo smo vključili dva načina uporabe bika (N_i): osemenjevanje in pripust. V izračun niso vštetili biki cikaste pasme in določeni biki mesnih pasem, ki so se uporabljali za pripust in osemenjevanje hkrati.

Za analizo vpliva izvora bika (domač, tuj) na verjetnost ovrženega porekla smo uporabili naslednji model binarne logistične regresije:

$$\ln(p_i / (1 - p_i)) = \mu + I_i \quad \dots(5)$$

- p_i verjetnost ovrženega porekla,
 μ srednja vrednost za lastnost,
 I_i vpliv i-tega izvora bika (domač, tuj).

Za analizo razlik med izidi preverjanja (ovržen oče, ovržena mati, ovržena oba starša, porekla nismo mogli ovreči) smo uporabili naslednji model nominalne logistične regresije:

$$\ln(p_i / (1 - p_o)) = \mu_i \quad \dots(6)$$

- p_i verjetnost ovrženega porekla (0, 1, 2, 3, 4)
 p_o verjetnost ovrženega porekla pri očetu,
 μ_i srednja vrednost za lastnost.

Zbrane podatke smo obdelali z modelom logistične regresije s proceduro LOGISTIC, kot optimizacijsko metodo smo uporabili Newton-Raphson. Analize smo izvedli s statističnim paketom SAS/STAT (SAS Institute Inc., 2011).

3.3.3 Genetska struktura populacije

Genetsko strukturo analiziranih teličk smo določili s programom STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard in sod., 2000), ki posameznim osebkom dodeli odstotek genotipa, ki prihaja od vsake K-te skupine čistih izvornih populacij v Hardy-Weinbergovem ravnotežju brez vnaprejšnjega poznavanja strukture preučevanih živali in frekvenc alelov izvornih populacij. V programu STRUCTURE smo za analizo uporabili model mešanja (*ang. admixture model*) in korelirane alelne frekvence med populacijami (*ang. correlated allele frequencies*). Monte Carlo markovska veriga (*ang. MCMC*) je tekla 100.000 iteracij po tem, ko smo začetnih 20.000 iteracij zavrgli. Število skupin oziroma klastrov (K) smo določili med ena in deset. Za vsako vrednost K smo naredili 20 ponovitev. Rezultate smo nato analizirali z metodo, ki določi najverjetnejšo vrednost za K (Evanno in sod., 2005).

3.3.4 Uporaba določitvenega testa

Za določanje verjetnosti, s katero posamezna telička pripada določeni pasmi na podlagi genotipa, smo uporabili računalniški program GeneClass2 (Piry in sod., 2004). Uporabili smo dva pristopa, ki na podlagi opazovanih frekvenc alelov v populaciji posameznim osebkom določita izvorno skupino (pasma):

- 1) Neposredni test (*ang. direct approach*) po metodi Paetkau in sod. (1995), ki temelji na verjetnostnem računu.
- 2) Test izključitve na podlagi simulacije (*ang. exclusion-simulation approach*) po metodi Cournet in sod. (1999), ki temelji na Bayesovem pristopu in zagotavlja raven verjetja (p-vrednosti). Po tem pristopu je bila posamezni telički pravilno dodeljena izvorna populacija (pasma), ko je bila izključena iz vseh populacij, razen iz populacije, kateri pripada, pri čemer smo preizkusili različne pragove verjetnosti $p < 0,05$, $p < 0,01$ in $p < 0,005$. Bayesov pristop ima to prednost, da ne domneva, da je populacija, ki ji posamezna žival pripada, med vzorčenimi oziroma referenčnimi populacijami. Našo referenčno populacijo so sestavljele vse teličke razen križank lisaste pasme z RH in MB (563 teličk črno-bele, 548 lisaste in 168 rjave pasme), testno populacijo pa vse teličke, vključno s križankami lisaste pasme z RH in MB (1474 živali).

4 REZULTATI

4.1 LASTNOSTI OZNAČEVALCEV V POPULACIJI IN VERJETNOST IZKLJUČITVE STARŠEV

Verjetnost izključitve na podlagi posameznega označevalca in za vse označevalce skupaj (preglednica 4) predstavlja verjetnost, da bomo ovrgli napačnega starša, in jo izračunamo na podlagi frekvenc označevalskih alelov (Dodds in sod., 1996). Ta parameter torej meri zmožnost detekcije napačnih porekел.

Označevalci, ki smo jih v našem delu uporabili, so bili pri vseh pasmah visoko polimorfni in so v povprečju imeli od 7,2 do 9,6 alelov na lokus (preglednica 4). Ker imajo ti lokusi visoko raven mutacij (od 0,0005 do 0,007 na generacijo), je neujemanje lahko tudi posledica mutacije. V praksi to največkrat pomeni podaljšanje oziroma skrajšanje alela za en nukleotidni motiv ali izgubo alela.

Za posamezni označevalec (preglednica 4) verjetnost izključitve znaša od 0,25 (TGLA126) do 0,76 (TGLA53). Verjetnost izključitve smo izračunali ob pogoju, da sta bila znana oba starša, za vsak označevalec posebej. Ob upoštevanju vseh 12 označevalcev je bila kombinirana verjetnost izključitve, izračunana po enačbi 2, pri vsaki od pasem več kot 0,99992. Z izbranim nizom mikrosatelitnih označevalcev je bilo torej možno učinkovito preverjati obstoječe rodovniške podatke.

Preglednica 4: Lastnosti označevalcev v populaciji potomk

Table 4: Markers characteristics in the progeny population

| Označevalec | Število alelov | | | | | Verjetnost izključitve* | | | |
|---------------------|----------------|---------|---------|---------|----------|-------------------------|----------|----------|----------|
| | Pasmo potomke | | | | | RJ | LS | LSX | ČB |
| | RJ | LS | LSX | ČB | Skupaj | | | | |
| BM1824 | 4 | 6 | 5 | 5 | 6 | 0,43 | 0,47 | 0,49 | 0,50 |
| BM2113 | 9 | 9 | 8 | 8 | 10 | 0,56 | 0,59 | 0,60 | 0,61 |
| ETH10 | 5 | 7 | 8 | 8 | 8 | 0,49 | 0,33 | 0,50 | 0,44 |
| ETH225 | 6 | 8 | 7 | 9 | 9 | 0,53 | 0,49 | 0,48 | 0,53 |
| ETH3 | 5 | 8 | 7 | 7 | 9 | 0,44 | 0,47 | 0,49 | 0,46 |
| INRA23 | 8 | 11 | 11 | 10 | 12 | 0,38 | 0,58 | 0,54 | 0,52 |
| SPS115 | 7 | 7 | 5 | 6 | 8 | 0,46 | 0,32 | 0,35 | 0,37 |
| TGLA122 | 9 | 14 | 14 | 15 | 21 | 0,54 | 0,46 | 0,52 | 0,68 |
| TGLA126 | 4 | 8 | 8 | 6 | 8 | 0,25 | 0,51 | 0,44 | 0,37 |
| TGLA227 | 10 | 12 | 12 | 13 | 13 | 0,68 | 0,68 | 0,69 | 0,67 |
| TGLA53 | 12 | 16 | 16 | 17 | 18 | 0,57 | 0,76 | 0,75 | 0,66 |
| BM1818 | 7 | 9 | 9 | 10 | 12 | 0,42 | 0,46 | 0,42 | 0,41 |
| Povprečje±SO/Skupaj | 7,2±2,5 | 9,6±3,1 | 9,2±3,4 | 9,5±3,8 | 11,2±4,4 | 0,999929 | 0,999967 | 0,999975 | 0,999976 |

RJ – rjava, LS – lisasta, LSX – križanke z lisasto pasmo, ČB – črno-bela, SO – standardni odklon

*verjetnost izključitve ob poznavanju genotipa na vseh mikrosatelitih pri obeh starših

RJ – Brown, LS – Simmental, LSX – crossbreeds with Simmental, ČB – Holstein, SO – standard deviation

* the likelihood of exclusion in the knowledge of the genotype at all microsatellites with both parents

4.2 DELEŽ NEUJEMANJ V POREKLIH

4.2.1 Delež neujemanj v poreklih po letih in pasmah

Rezultati preverjanja porekla pri teličkah kažejo na zelo velik delež neujemanj v letih 2010 in 2011 zlasti pri lisasti pasmi pa tudi pri križankah lisaste pasme z RH in MB (preglednica 5). Pri teličkah lisaste pasme je bil odstotek neujemanj v poreklu v letih 2010 in 2011 25,8 % in 25,3 %, medtem ko je bilo neujemanj pri teličkah rjave in črno-bele pasme v istem obdobju manj kot 10 %. Teličke črno-bele pasme in križanke lisaste pasme z RH in MB so imele v vseh petih letih skupaj v povprečju manj kot 10 % neujemanj v poreklu, teličke rjave pasme pa le 5,6 %. Pri teličkah lisaste pasme, kjer je bilo v povprečju v petih letih 16,7 % neujemanj v poreklu, je bil v letu 2014 delež neujemanj v poreklu prvič pod 10 %.

V primerjavi z letom 2010, ko je bilo pri vseh pasmeh skupaj 15,5 % neujemanj v poreklih, jih je bilo v letu 2014 le še 8,8 %. V letu 2014 je bilo pri teličkah rjave pasme 6,5 % ovrženih porekel, pri lisasti 9,6 % in pri črno-beli pasmi 8,8 %, kar je bolje, kot smo pričakovali. Pri teličkah lisaste pasme smo pričakovali največji delež neujemanj v poreklih predvsem zaradi neujemanja z očeti, saj se plemenski biki, ki so prisotni na obratu, uporablajo tudi za pripuste, ki pa so slabše nadzorovani od osemenitev, vendar je bil odstotek neujemanj v dobrini četrtini vseh porekel v letu 2010 presenetljivo velik. Največja sprememba v deležu ovrženih porekel pri lisasti pasmi se je zgodila ob koncu leta 2011, ko se je delež ovrženih porekel skoraj prepolovil (iz 25,3 % na 13,8 %). Delež neujemanj pri lisasti pasmi v povprečju za vsa leta skupaj (16,7 %) je še vedno večji, kot smo pričakovali glede na literaturne vire, vendar je spodbuden podatek, da je bilo v letu 2014 le še 9,6 % neujemanj (preglednica 5). Pri črno-beli pasmi je bil delež neujemanj v okviru pričakovanj. Med rjavo in črno-belo pasmo nismo pričakovali razlik, saj sta to pasmi z mlečno usmeritvijo, kar pomeni, da na kmetijah večinoma ni prisotnih spolno zrelih bikov pitancev. Kljub temu je rjava pasma s 5,6 % neujemanj v poreklu skozi vsa leta dosegla občutno boljše rezultate v primerjavi z drugimi pasmami in je imela manj napak, kot smo pričakovali.

Pri drugih pasmah (rdeči holštajn, limuzin, šarole in cikasta pasma) je bilo v naključno preverjanje porekla v letih 2010–2014 zaradi manjše zastopanosti v populaciji goveda v Sloveniji zajeto majhno število živali (do 10 pri cikasti pasmi), vendar so rezultati pokazali velik obseg neujemanj (največ pri cikasti pasmi, v povprečju vseh let skupaj 30 % neujemanj). Pri teh pasmah je bil skupni delež neujemanj v poreklu skozi vsa leta skupaj velik (20 %), zato bo za vsako pasmo treba zbrati več podatkov za natančnejšo oceno (preglednica 5).

Preglednica 5: Delež neujemanj v poreklih glede na pasmo potomke po letih

Table 5: Percentage of pedigree errors according to the breed of offspring per year

| Pasma/ križanje potomke | Leto prejema vzorca | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------|------|------|------|------|--------|
| | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | Skupaj |
| Lisasta | Št. potrjenih porekel | 181 | 218 | 207 | 258 | 282 |
| | Št. ovrženih porekel | 63 | 74 | 33 | 30 | 30 |
| | Skupaj | 244 | 292 | 240 | 288 | 312 |
| | Delež neujemanj (%) | 25,8 | 25,3 | 13,8 | 10,4 | 9,6 |
| Križ. lisaste pasme z RH in MB | Št. potrjenih porekel | 72 | 83 | 67 | 75 | 70 |
| | Št. ovrženih porekel | 12 | 12 | 1 | 7 | 5 |
| | Skupaj | 84 | 95 | 68 | 82 | 75 |
| | Delež neujemanj (%) | 14,3 | 12,6 | 1,5 | 8,5 | 6,7 |
| Črno-bela | Št. potrjenih porekel | 232 | 238 | 165 | 214 | 219 |
| | Št. ovrženih porekel | 22 | 24 | 15 | 15 | 21 |
| | Skupaj | 254 | 262 | 180 | 229 | 240 |
| | Delež neujemanj (%) | 8,7 | 9,2 | 8,3 | 6,6 | 8,8 |
| Rjava | Št. potrjenih porekel | 78 | 75 | 46 | 86 | 106 |
| | Št. ovrženih porekel | 6 | 3 | 1 | 6 | 7 |
| | Skupaj | 84 | 78 | 47 | 92 | 113 |
| | Delež neujemanj (%) | 7,1 | 3,8 | 2,1 | 6,5 | 6,5 |
| Ostale pasme | Št. potrjenih porekel | 9 | 4 | 5 | 7 | 11 |
| | Št. ovrženih porekel | 2 | 0 | 3 | 1 | 3 |
| | Skupaj | 11 | 4 | 8 | 8 | 14 |
| | Delež neujemanj (%) | 18,2 | 0 | 37,5 | 12,5 | 21,5 |
| Skupaj | Št. potrjenih porekel | 572 | 618 | 490 | 640 | 688 |
| | Št. ovrženih porekel | 105 | 113 | 53 | 59 | 66 |
| | Skupaj | 677 | 731 | 543 | 699 | 754 |
| | Delež neujemanj (%) | 15,5 | 15,5 | 9,8 | 8,4 | 8,8 |
| | | | | | | 11,6 |

Proučevane vplive na pravilnost porekla smo ovrednotili s statistično analizo, s pomočjo katere smo dobili ocenjena razmerja med posameznimi razredi neodvisnih spremenljivk in regresijske koeficiente za vpliv leta, kar nam je omogočilo potrditev ali zavrnitev hipotez.

Razlike med genotipi v verjetnosti, da bo poreklo ovrženo, smo potrdili ($p=0,0014$) s statistično analizo z logit modelom (enačba 3). Ugnezdana regresija je bila statistično značilna ($p<0,0001$). Verjetnost, da bomo poreklo ovrgli, se je spremenjala tekom let preverjanja porekla pri lisasti pasmi ($p<0,0001$), trend ($p=0,0518$) smo zaznali tudi pri križankah lisaste pasme z RH in MB (preglednica 6). S Hosmer-Lemeshowim preizkusom skladnosti smo potrdili ustreznost modela ($p=0,6133$).

Preglednica 6: Regresijski koeficienti za vpliv leta preverjanja porekla na verjetnost ovrženega porekla

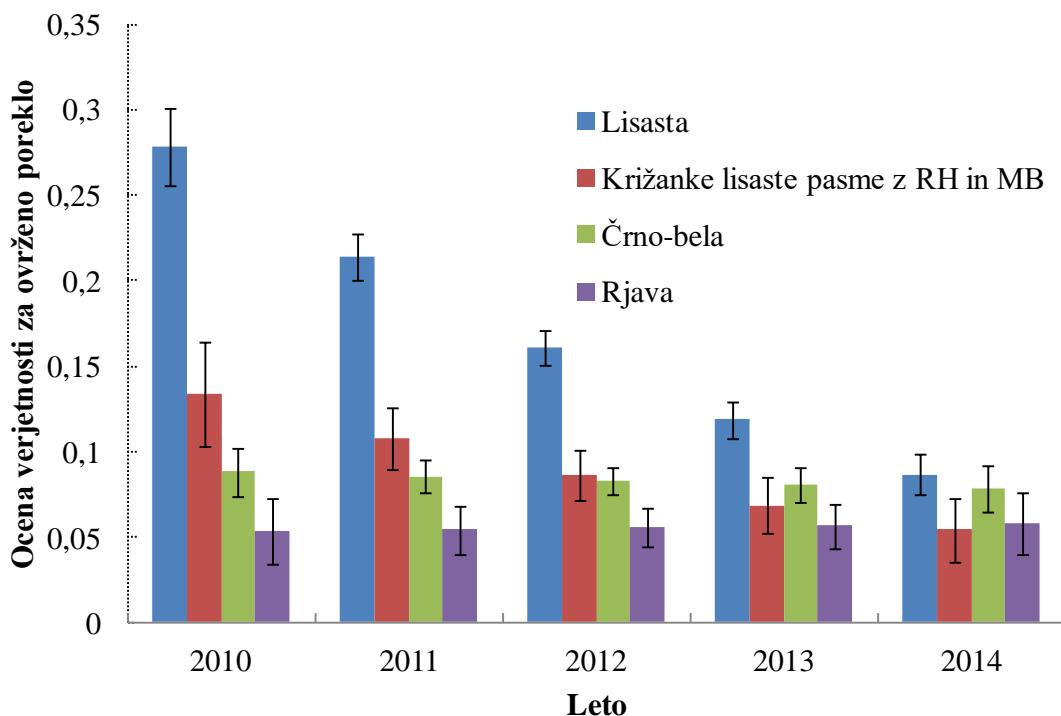
Table 6: Regression coefficients for the effect of the year of pedigree testing on pedigree errors

| Genotip | b | Standardna napaka | e^b | Standardna napaka za e^b | p-vrednost |
|-----------------------------------|--------|-------------------|-------|----------------------------|------------|
| Lisasta | -0,351 | 0,054 | 0,704 | 1,055 | <0,0001 |
| Križanke lisaste pasme z RH in MB | -0,248 | 0,128 | 0,780 | 1,136 | 0,0518 |
| Črno-bela | -0,032 | 0,073 | 0,969 | 1,076 | 0,6660 |
| Rjava | 0,020 | 0,142 | 1,020 | 1,153 | 0,8873 |

b – ocena regresijskega koeficienta, e^b – antilogaritem ocene regresijskega koeficienta

b – regression coefficient estimate, e^b – antilogarithm of the regression coefficients estimates

Obet za potrjeno poreklo se je na leto povečal za faktor, ki je enak antilogaritmu ocene regresijskega koeficienta (preglednica 6). Pri lisasti pasmi je bil statistično značilen trend zmanjševanja števila napak v poreklu po letih za faktor 0,704, pri križankah lisaste pasme z RH in MB pa za 0,780. Pri rjavi in črno-beli pasmi nismo zaznali spremenjanja verjetnosti ovrženega porekla po letih.



Slika 6: Ocene verjetnosti s standardnimi napakami za ovrženo poreklo glede na genotip in leto preverjanja porekla

Figure 6: Estimates of the likelihoods and standard errors of the pedigree errors according to the genotype and the year of pedigree verification

Ocenjena verjetnost, da bo poreklo ovrženo, je bila v obdobju 2010–2014 največja pri lisasti pasmi (slika 6). Razlika v oceni verjetnosti med lisasto pasmo in med križankami lisaste pasme z RH in MB ter črno-belo in rjavo pasmo se je skozi leta zmanjševala in v letu 2014 ni več statistično značilna.

Preglednica 7: Razmerje obetov in 95 % interval zaupanja za delež napak v poreklu po genotipih in letih

Table 7: Odds ratio and 95% confidence interval for percentage of pedigree errors stratified by genotype and year

| Lisasta proti rjavi | | | | |
|--|-----------------|------------------------|------------|---------|
| Leto | Razmerje obetov | 95 % Interval zaupanja | p-vrednost | |
| 2010 | 6,854 | 3,141 | 14,956 | <0,0001 |
| 2011 | 4,729 | 2,694 | 8,304 | <0,0001 |
| 2012 | 3,263 | 2,080 | 5,118 | <0,0001 |
| 2013 | 2,252 | 1,344 | 3,771 | 0,0020 |
| 2014 | 1,554 | 0,762 | 3,167 | 0,2253 |
| Lisasta proti črno-beli | | | | |
| Leto | Razmerje obetov | 95 % Interval zaupanja | p-vrednost | |
| 2010 | 3,998 | 2,658 | 6,014 | <0,0001 |
| 2011 | 2,905 | 2,171 | 3,886 | <0,0001 |
| 2012 | 2,111 | 1,634 | 2,727 | <0,0001 |
| 2013 | 1,534 | 1,101 | 2,136 | 0,0113 |
| 2014 | 1,114 | 0,700 | 1,775 | 0,6481 |
| Lisasta proti križankam lisaste pasme z RH in MB | | | | |
| Leto | Razmerje obetov | 95 % Interval zaupanja | p-vrednost | |
| 2010 | 2,494 | 1,427 | 4,36 | 0,0013 |
| 2011 | 2,251 | 1,513 | 3,35 | <0,0001 |
| 2012 | 2,032 | 1,377 | 2,999 | 0,0004 |
| 2013 | 1,834 | 1,068 | 3,149 | 0,0279 |
| 2014 | 1,655 | 0,773 | 3,547 | 0,1949 |
| Križanke lisaste pasme z RH in MB proti rjavi | | | | |
| Leto | Razmerje obetov | 95 % Interval zaupanja | p-vrednost | |
| 2010 | 2,748 | 1,111 | 6,798 | 0,0287 |
| 2011 | 2,101 | 1,095 | 4,031 | 0,0256 |
| 2012 | 1,606 | 0,921 | 2,802 | 0,0953 |
| 2013 | 1,228 | 0,616 | 2,448 | 0,5600 |
| 2014 | 0,939 | 0,359 | 2,453 | 0,8971 |
| Črno-bela proti rjavi | | | | |
| Leto | Razmerje obetov | 95 % Interval zaupanja | p-vrednost | |
| 2010 | 1,714 | 0,754 | 3,899 | 0,1985 |
| 2011 | 1,628 | 0,900 | 2,945 | 0,1070 |
| 2012 | 1,546 | 0,963 | 2,481 | 0,0711 |
| 2013 | 1,468 | 0,854 | 2,523 | 0,1646 |
| 2014 | 1,394 | 0,660 | 2,945 | 0,3840 |
| Črno-bela proti križankam lisaste pasme z RH in MB | | | | |
| Leto | Razmerje obetov | 95 % Interval zaupanja | p-vrednost | |
| 2010 | 0,624 | 0,337 | 1,154 | 0,1327 |
| 2011 | 0,775 | 0,500 | 1,202 | 0,2546 |
| 2012 | 0,963 | 0,635 | 1,459 | 0,8573 |
| 2013 | 1,196 | 0,679 | 2,104 | 0,5355 |
| 2014 | 1,485 | 0,670 | 3,290 | 0,3297 |

p-vrednost, razmerje obetov in 95 % interval zaupanja (Wald) smo računali z binarno logistično regresijo
 p-value, odds ratio and 95% confidence interval (Wald) calculated with binary logistic regression

Primerjava tveganj za število napak v poreklu glede na genotip je pokazala, da so bile največje razlike v verjetnosti, da je bilo poreklo ovrženo, med lisasto in rjavo pasmo ter lisasto in črno-belo pasmo v letih 2010, 2011 in 2012 (preglednica 7). Lisasta pasma je imela v letu 2010 kar 6,854 krat večji obet za napake v poreklu v primerjavi z rjavo pasmo in 3,998 krat večji obet za napake glede na črno-belo pasmo. Skozi leta se je ta razlika zmanjševala in se je v letu 2012 glede na omenjeni pasmi prepolovila. Po letu 2012 med vsemi pasmami in križanji ni bilo statistično značilnih razlik v deležu napak v poreklih. Lisasta pasma je imela statistično značilno večji obet za število napak v poreklu glede na križanke lisaste pasme z RH in MB v letih 2010, 2011 in 2012. To je posledica dejstva, da se za osemenjevanje križank lisaste pasme z RH in MB poleg bikov lisaste pasme uporabljajo tudi biki pasem rdeči holštajn in montbeliard, ki so se s potomkami v večji meri ujemali. Statistično značilne razlike so tudi med križankami lisaste pasme z RH in MB ter rjavo pasmo, vendar le v letih 2010 in 2011. Med črno-belo in rjavo pasmo ter med črno-belo in križankami lisaste pasme z RH in MB v nobenem letu ni bilo statistično značilnih razlik.

4.2.2 Delež neujemanj v poreklu glede na starša

V letih 2010–2014 je bilo pri vseh pasmah skupaj neujemanje z očetom v povprečju prisotno v 9,6 % vseh porekel, v 1,2 % porekel pa se ni ujemal nobeden od staršev (preglednica 8). Delež ovrženih porekel, v katerih je bila ovržena samo mati, je bil med 0,5 % in 1,3 % in je bil največji v letih 2013 in 2014 (0,9 % in 1,3 %), ko smo se v izboru bolj osredotočili na reje, kjer je možnost zamenjave teličke po rojstvu večja. Delež porekel, v katerih se ni ujemal nobeden od staršev, je bil vsa leta na podobni ravni, med 1,1 % in 1,3 %. Neujemanje z materjo (ob pogoju, da je bil oče pravi) je bilo najmanj pogosto in je bilo v povprečju prisotno le v 0,8 % preverjenih porekel. Tovrstna neujemanja smo opazili v rejah, kjer uporabljajo manjše število plemenskih bikov (ozioroma bikovega semena), redkeje celo samo enega za osemenjevanje krav v čredi.

Preglednica 8: Število preverjenih poreklov in delež neujemanj v poreklu glede na starša

Table 8: Number of pedigrees verified and percentage of pedigree errors, according to parents

| Status preverjanja | Število preverjanj | Leto prejema vzorca | | | | | |
|--------------------------|---------------------|---------------------|------|------|------|------|--------|
| | | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | Skupaj |
| Porekla ne moremo ovreči | Število preverjanj | 572 | 618 | 490 | 640 | 688 | 3008 |
| Porekla ne moremo ovreči | Delež (%) | 84,5 | 84,5 | 90,2 | 91,6 | 91,2 | 88,4 |
| Ovržen je samo oče | Število preverjanj | 91 | 101 | 44 | 45 | 46 | 327 |
| Ovržen je samo oče | Delež neujemanj (%) | 13,4 | 13,8 | 8,1 | 6,4 | 6,1 | 9,6 |
| Ovržena je samo mati | Število preverjanj | 5 | 4 | 3 | 6 | 10 | 28 |
| Ovržena je samo mati | Delež neujemanj (%) | 0,7 | 0,5 | 0,6 | 0,9 | 1,3 | 0,8 |
| Ovržena sta oba starša | Število preverjanj | 9 | 8 | 6 | 8 | 10 | 41 |
| Ovržena sta oba starša | Delež neujemanj (%) | 1,3 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,2 |
| Skupaj | Število preverjanj | 677 | 731 | 543 | 699 | 754 | 3404 |
| Skupaj | Delež neujemanj (%) | 15,5 | 15,5 | 9,8 | 8,4 | 8,8 | 11,6 |

Delež poreklov, v katerih je bil ovržen samo oče, se je skozi leta močno zmanjšal (preglednica 8). V letih 2010 in 2011 je bil delež neujemanj z očetom pri vseh pasmah skupaj 13,4 % in 13,8 %, po letu 2012 pa je delež teh neujemanj znašal manj kot 8 % in v letu 2014 le še 6 %. Delež neujemanj po očetu, ki je najpogostejši vir neujemanj, se je pri vseh pasmah v celotnem obdobju preverjanja več kot prepolovil. Razlog je prav gotovo v tem, da smo na področju preverjanja porekla pri govedu uvedli dodatno preverjanje porekla z metodo večje zanesljivosti. Z uvedbo naključnega preverjanja porekla se je posledično povečala točnost podatkov.

Preglednica 9: Razmerje obetov za ovrženo poreklo glede na izid preverjanja

Table 9: Odds ratio for pedigree errors according to the outcome of the verification

| Izid preverjanja | Razmerje obetov | p-vrednost |
|----------------------------------|-----------------|------------|
| V poreklu je ovržena mati | 0,086 | <0,0001 |
| V poreklu sta ovržena oba starša | 0,125 | <0,0001 |
| Porekla ne moremo ovreči | 9,199 | <0,0001 |

Referenčna skupina je "v poreklu je ovržen oče"

The reference group was "misidentified father"

S statistično analizo z logit modelom (enačba 6) smo potrdili hipotezo, da je verjetnost, da bo v poreklu ovržen oče, večja od verjetnosti, da bo v poreklu ovržena mati ($p=0,0001$). Teličke so imele v povprečju 0,086 krat manj neujemanj z materami kot z očeti, kar pomeni, da so bili očetje 11,6 krat pogosteje ovrženi kot matere (preglednica 9).

4.2.3 Delež neujemanj v poreklu glede na izvor in način uporabe bika

Preverili smo, ali je pravilnost porekel po očetovi strani odvisna od izvora in načina uporabe bika. V tem primeru je šlo za delež porekel, v katerih ni bilo ujemanja z očeti, in v izračun nismo vključili porekel, kjer je bilo dokazano neujemanje z mamo ali z obema staršema hkrati. Ne glede na pasmo se biki, katerih je bilo seme kupljeno v tujini (v republiški številki imajo na prvem mestu oznako 7 ali 4), niso ujemali s potomkami v 2,6 % primerov (11 neujemanj z očeti od skupno 419 preverjenih porekel). Delež neujemanj s potomkami pri domačih plemenskih bikih pa je znašal kar 10,6 % (316 izmed 2985 preverjenih porekel) (preglednica 10). Velike razlike v pravilnosti porekel med domačimi in tujimi plemenskimi biki lahko delno pripisemo temu, da rejci in osemenjevalci pri uporabi uvoženega semena z večjo natančnostjo beležijo osemenitve. Drugi razlog pa je bil v osemenjevalnih centrih, kjer seme pakirajo, in so bili le-ti po naših ugotovitvah (Logar in Opara, 2011) pomemben vir napak v poreklu.

Preglednica 10: Število preverjenih očetovstev in delež neujemanj v poreklu glede na izvor in način uporabe očeta

Table 10: Number of paternities verified and percentage of pedigree errors depending on the origin and use of sire

| Biki glede na izvor in način uporabe | Število vseh bikov | Število preverjanj porekel | Število ovrženih porekel | Delež ovrženih porekel (%) |
|--------------------------------------|--------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Domači biki | 406 | 2985 | 316 | 10,6 |
| Tuji biki | 184 | 419 | 11 | 2,6 |
| Skupaj | 590 | 3404 | 327 | 9,6 |
| Za pripust* | 35 | 55 | 2 | 3,6 |
| Za osemenjevanje | 546 | 3341 | 322 | 9,6 |
| Skupaj | 581 | 3396 | 324 | 9,5 |

*V izračun niso všteti biki cikaste pasme in določeni biki mesnih pasem, ki so se uporabljali za pripust in osemenjevanje hkrati

*Cika bulls and certain beef breeds were excluded from the calculation, because they have been used for insemination and natural matings at the same time

Nadalje smo preverili pravilnost porekel glede na način uporabe bika. Delež neujemanj v poreklih, kjer se oče v pripstu ni ujemal s potomko, je znašal 3,6 % (preglednica 10). Ovrženi sta bili le 2 porekli izmed 55 preverjenih potomcev bikov iz naravnega pripusta. Ovrgli pa smo 4 (7,3 %) matere, ki so bile v pripstu in se niso ujemale s potomkami (podatki niso prikazani).

Preglednica 11: Razmerje obetov in 95 % interval zaupanja za delež napak v poreklu glede na izvor in način uporabe bika

Table 11: Odds ratio and 95% confidence interval for percentage of pedigree errors stratified by the origin and use of sire

| | Razmerje obetov | 95 % interval zaupanja | p-vrednost |
|-------------------------------|-----------------|------------------------|------------|
| Domači biki proti tujim bikom | 4,391 | 2,386 - 8,083 | 0,0001 |
| Osemenitve proti pripustom | 2,929 | 0,712 - 12,053 | 0,1365 |

Na delež napak v poreklu je statistično značilno vplival izvor bika, način uporabe bika pa ni bil statistično značilen (preglednica 11). Primerjava tveganj za število napak v poreklu je pokazala, da so bile verjetnosti za napake med biki glede na izvor različne. Pri domačih bikih je bilo statistično značilno več napak v poreklu potomk glede na tuje bike. Domači biki so imeli kar 4,391 krat večji obet za napake v poreklu potomk v primerjavi s tujimi

biki. Razlik v načinu uporabe bika nismo potrdili zaradi premajhnega števila opazovanj, saj sta bili v vseh letih le dve ovrženi porekli potomki bikov v pripustu.

4.3 POPULACIJSKA ANALIZA

Vse pasme in križanke (preglednica 12) so se med seboj genetsko razlikovale, saj so vse F_{ST} vrednosti (Weir in Cockerham, 1984) statistično značilne ($p < 0,001$). Povprečna F_{ST} vrednost čistih pasem je bila 0,084, vključno s križankami lisaste pasme z RH in MB pa 0,064. Najmanjša vrednost (0,0053) je bila med lisasto pasmo in križankami lisaste pasme z RH in MB, največja vrednost (0,0953) pa med rjavo in lisasto pasmo.

Preglednica 12: Vrednost parnih primerjav med pasmami/križanjimi na osnovi dvanajstih mikrosatelitnih označevalcev (nad diagonalo) in statistična značilnost vrednosti F_{ST} (pod diagonalo)

Table 12: Pairwise F_{ST} values between breeds/crosses on the basis of twelve microsatellite markers (above diagonal) and statistical significance for F_{ST} values (below the diagonal)

| Pasma / križanje | Črno-bela | Lisasta | Rjava | Križ. lisaste pasme z RH in MB |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------------|
| Črno-bela | - | 0,0756 | 0,0807 | 0,0500 |
| Lisasta | $p < 0,001$ | - | 0,0953 | 0,0053 |
| Rjava | $p < 0,001$ | $p < 0,001$ | - | 0,0768 |
| Križ. lisaste pasme z RH in MB | $p < 0,001$ | $p < 0,001$ | $p < 0,001$ | - |

Maudet in sod. (2002) so v študiji na sedmih pasmah govedi izračunali povprečno vrednost F_{ST} 0,08 (največjo 0,112 med pasmama holštajn in abondance, najmanjšo 0,043 pa med pasmama montbéliarde in villard).

Vse pasme so bile v Hardy-Weinbergovem ravnotežju (HWE) (preglednica 13). Opažena heterozigotnost (H_o), ki je merilo genetske variabilnosti populacije, je bila najmanjša pri rjavi pasmi (0,703), pri drugih pasmah pa je bila vrednost nekoliko večja (od 0,720 do 0,736) (preglednica 13). Tudi povprečno število alelov na lokus je bilo najmanjše pri rjavi

pasmi (7,2), zato jo lahko označimo kot genetsko najmanj pestro izmed treh proučevanih pasem. Največje povprečno število alelov na lokus smo našli pri lisasti pasmi (9,6).

Preglednica 13: Parametri genetske pestrosti na podlagi mikrosatelitnih označevalcev

Table 13: Genetic diversity indices based on microsatellite markers

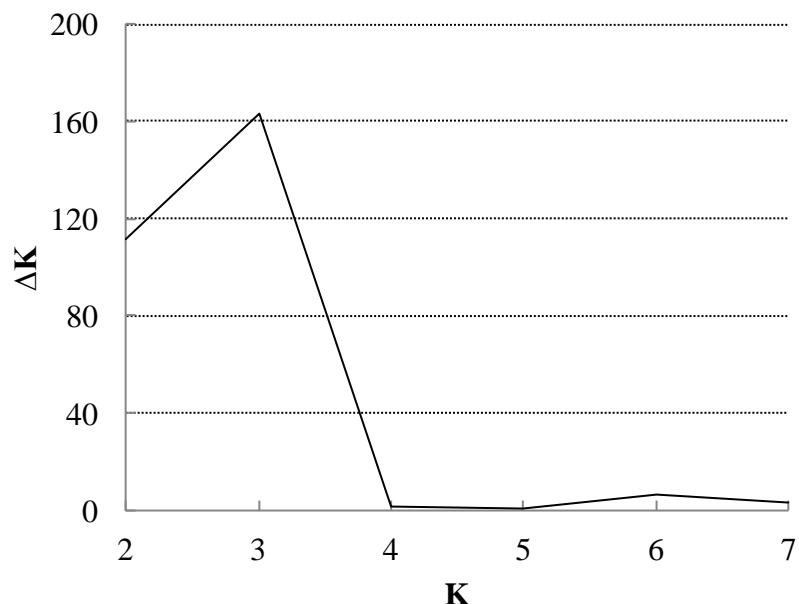
| Pasma/križanje | N | H _E ±SO | H _O ±SO | A±SO | F _{IS} |
|--------------------------------|-----|--------------------|--------------------|---------|-----------------|
| Rjava | 168 | 0,703±0,095 | 0,705±0,098 | 7,2±2,5 | -0,002 |
| Lisasta | 548 | 0,720±0,088 | 0,725±0,091 | 9,6±3,1 | -0,007 |
| Križ. lisaste pasme z RH in MB | 195 | 0,736±0,087 | 0,732±0,094 | 9,2±3,4 | 0,005 |
| Črno-bela | 563 | 0,733±0,092 | 0,732±0,093 | 9,5±3,8 | 0,002 |

N: število živali; H_E: pričakovana heterozigotnost v populaciji; SO: standardni odklon; H_O: opažena heterozigotnost; A: povprečno število alelov na lokus; F_{IS}: koeficient parjenja v sorodstvu – vrednosti ne odstopajo statistično značilno od HWE (P<0,001)

N: number of individuals; H_E: expected heterozygosity in the population; SD: standard deviation; H_O: observed heterozygosity; A: average number of alleles per loci; F_{IS}: inbreeding coefficient – values showed no statistically significant deviations from HWE (P<0.001)

4.4 GENETSKA STRUKTURA POPULACIJE GOVEDA V SLOVENIJI

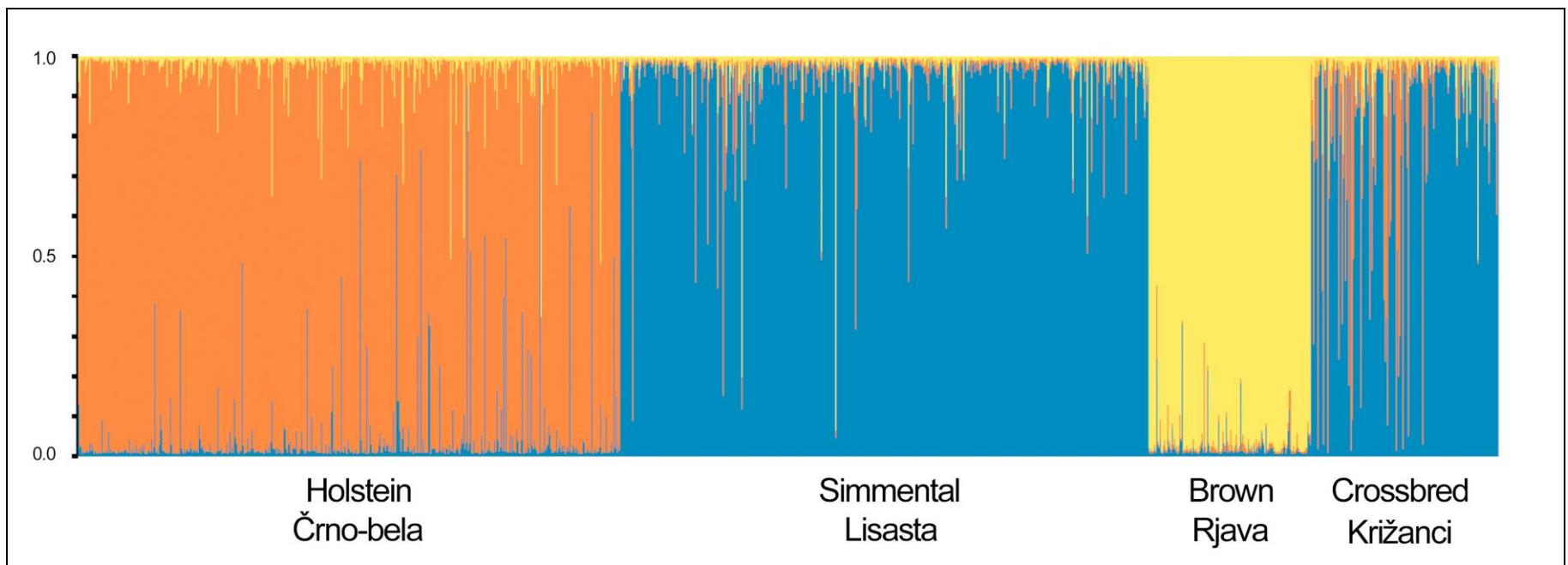
Z metodo ΔK , kot so jo opisali Evanno in sod. (2005), smo določili modalno vrednost statistike $K=3$, ki se ujema s tremi glavnimi pasmami: črno-belo, lisasto in rjavo (slika 7). Na sliki 8 različne barve predstavljajo različne izvorne genetske skupine. Vsak stolpec predstavlja posameznika, katerega genetski ustroj je pojasnjen z deležem (q) posamezne izvorne skupine. Križanke lisaste pasme z RH in MB ne oblikujejo svoje genetske skupine in so najbolj podobne lisasti pasmi, z večjim deležem primesi črno-bele pasme.



Slika 7: Graf ΔK vrednosti pri posameznih K vrednostih po metodi, ki so jo opisali Evanno in sod. (2005), določa najverjetnejši $K=3$

Figure 7: Graph ΔK values for each K value according to the method described by Evanno et al. (2005) provides the most likely $K=3$

Program STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) določi delež zastopanosti (q) posamezne izvorne populacije (K) za vsakega posameznika. Teličke so pretežno pripadale izvorni pasemski skupini (opredeljena kot $q>0,5$), ki so ji tudi dejansko pripadale glede na rodovniške podatke (in posledično tudi glede na fenotip), le nekaj je bilo odstopanj. Pri črno-beli pasmi je bilo 11 teličk opredeljenih kot lisaste pasme in tri kot rjave pasme (skupno 98 % opredeljenih z dejansko pasmo). Pri lisasti pasmi so bile 4 teličke opredeljene kot črno-bela pasma in ena kot rjava pasma (skupaj 99 % opredeljenih z ustrezno pasmo). Vse teličke rjave pasme so tudi po genotipu ustrezaile rjavi pasmi. Križanke lisaste pasme z RH in MB je v največji meri sestavljal genotip lisaste pasme (165 osebkov), manj črno-bele pasme (23), najmanj pa rjave (1), medtem ko 6 križank lisaste pasme z RH in MB ni imelo večjega vpliva katerekoli od treh izvornih pasem s $q>0,5$ (slika 8). To je posledica pogoja, da imajo križanke lisaste pasme z RH in MB v svoji pasemski sestavi lahko, poleg lisaste pasme, od 14 % do 86 % pasme rdeči holštajn in/ali montbeliard.



Najbolj verjetno število skupin ($K=3$) temelji na metodi ΔK (Evanno in sod., 2005). Različne barve predstavljajo različne izvirne genetske skupine. Vsak stolpec predstavlja posameznika, katerega genetski ustroj je pojasnjen z deležem (q) posamezne izvirne skupine.
The most probable number of clusters ($K=3$) is based on ΔK method (Evanno et al., 2005). A different color represents different genetic groups or clusters. Each column represents an individual and the amount of a given color in a column reflects the relative contribution (q) of a given cluster to its genetic makeup.

Slika 8: Ocenjena struktura populacije naključno izbranih teličk, kot izhaja iz programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) na podlagi podatkov mikrosatelitnih označevalcev

Figure 8: Estimated population structure as inferred by the STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) analysis of the microsatellite markers data

4.5 DOLOČITVENI TEST

Neposredni test, ki so ga opisali Paetkau in sod. (1995), omogoča pravilno razporeditev 98,2 % do 100 % posameznikov glede na njihovo pasmo z uporabo 12 mikrosatelitnih lokusov na treh pasmah goveda (lisasta, črno-bela in rjava). Največjo uspešnost (100 %) smo dobili pri rjavi pasmi (preglednica 14), kjer so bile vse teličke prepoznane kot rjave. Križanke lisaste pasme z RH in MB so bile razvrščene v lisasto (83,6 %), črno-belo (14,9 %) in rjavo (1,5 %) pasmo. Tako razvrstitev smo pričakovali na osnovi predhodne analize s programom STRUCTURE (Pritchard et al., 2000).

Preglednica 14: Rezultati določitvenih testov glede na pristop

Table 14: Breed assignment test results in relation to the approach

| Izvorna pasma/križanje | Pripadajoča pasma/križanje | Delež posameznikov z ustrezno pasmo (%) | | |
|---|-------------------------------|---|--------|------------------------------|
| | | a) Paetkau in sod. (1995) | | b) Cournet in sod. (1999) |
| | | p<0,05 | p<0,01 | p<0,005 |
| Rjava | Rjava | 100,0 | 66,7 | 59,3 |
| Lisasta | Lisasta | 98,5 | 81,4 | 70,4 |
| Črno-bela | Črno-bela | 98,2 | 81,2 | 74,6 |
| Križanke lisaste pasme z RH in MB | Rjava | 1,5 | 0,0 | 0,0 |
| | Lisasta | 83,6 | 53,8 | 46,2 |
| | Črno-bela | 14,9 | 6,7 | 6,2 |
| | | | | 4,1 |

a) neposredni test in b) test izključitve na podlagi simulacije

a) direct approach and b) exclusion-simulation approach

S testom izključitve na podlagi simulacije, ki temelji na Bayesovem principu (Cournet in sod., 1999), smo posamezni telički pravilno dodelili izvorno populacijo (pasma) glede na različne pragove zaupanja. Pri $p<0,05$ smo pravilno določili 81,4 % teličk lisaste pasme in 81,2 % teličk črno-bele pasme (preglednica 14). Pri rjavi pasmi smo bili manj uspešni, saj smo pravilno dodelili izvorno populacijo 66,7 % teličkam. Pri podrobnejšem pregledu živali, ki v tem delu ni prikazano, smo ugotovili, da so bile teličke rjave pasme, ki so imele velik delež ameriške rjave pasme, pogosto razvrščene

v rjavo in v črno-belo pasmo hkrati. To pa je bil razlog, da so bile izključene iz skupine rjavih in posledično je bil manjši uspeh določitvenega testa po tej metodi. Križanke lisaste pasme z RH in MB smo razvrstili v lisasto (53,8 %) in črno-belo (6,7 %). Nobene križanke lisaste pasme z RH in MB nismo razvrstili med rjave, kar je bilo v skladu z našimi pričakovanji. Pri podrobнем pregledu živali, ki v tem delu ni zajeto, smo ugotovili, da so bile križanke lisaste pasme z RH in MB, ki so imele velik delež pasme rdeči holštajn v svoji pasemski sestavi, razvrščene v skupino črno-bele pasme.

Pri mejni vrednosti $p<0,005$ smo lahko pravilno razvrstili le še 61,8 % teličk črno-bele pasme, pri rjavi in lisasti pasmi pa je bila uspešnost 44,6 % in 58,8 % (preglednica 14). Metoda določitvenega testa in določena mejna vrednost praga zaupanja je zelo vplivala na rezultat. Delež teličk, ki jim je bila pasma pravilno dodeljena, se je s povečevanjem praga zaupanja zmanjševal. Prednost tega pristopa določitvenega testa je, da ne domneva, da je populacija, ki ji posamezna žival pripada, med vzorčenimi oziroma referenčnimi populacijami.

5 RAZPRAVA

5.1 NEUJEMANJA V POREKLIH

Ta študija je pokazala, da kljub skrbi za natančno vodenje porekel pri teh še vedno prihaja do neujemanj. Čeprav možnosti napak pri vzorčenju ne moremo povsem izključiti, menimo, da je večina neskladij posledica napak, ki smo jih v tem delu navedli. Z opozarjanjem rejcev, osemenjevalnih centrov in kontrolorjev na napake in z odpravljanjem teh napak lahko zagotovljamo zanesljivejše podatke o poreklu, kar je razvidno tudi iz tega, da se delež neujemanj iz leta v leto zmanjšuje.

5.1.1 Delež neujemanj v poreklih v Sloveniji v letih 2010–2014

Pričakovani delež neujemanj v naši populaciji je bil na podlagi primerjave s tujimi viri med 10 % in 15 %. Rezultati kažejo, da je bil v populaciji goveda v kontroli porekla in prireje v Sloveniji v letih 2010–2014 skupni delež neujemanj (oče, mati, oba starša) 11,6 %. Od leta 2010 do 2014 se je delež neujemanj zmanjševal (od 15,5 % na 8,4 %), kljub temu da so bile v letih 2012, 2013 in 2014 v naključnem izboru zajete živali z večjim tveganjem za ovrženo poreklo. Izboljšanje rezultatov in povečano skrb za točnost podatkov lahko pripisemo uvedbi naključnega preverjanja porekla in razkritju ključnih napak, zaradi katerih je prihajalo do sistematičnih neskladij.

Med pasmami smo pričakovali razlike. Delež neujemanj je bil največji pri lisasti pasmi (16,7 %), sledile so križanke lisaste pasme z RH in MB (9,2 %), med črno-belo pasmo (8,3 %) in rjavo pasmo (5,6 %) pa nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Glede na pasmo smo pričakovali, da bo pri teličkah lisaste pasme večji delež neujemanj zaradi neujemanja z očeti, saj se domači biki uporabljajo tudi za pripuste, ki so nadzorovani v manjši meri kot osemenitve. Izkazalo se je, da je bilo pri lisasti pasmi res največ neujemanj v poreklu in da so bila neujemanja predvsem na račun očetov. Glavni vzrok neujemanj niso bili nenadzorovani pripusti, kot smo predvidevali, ampak je šlo predvsem za napake pri pakiranju semena posameznih bikov na osemenjevalnem centru. Med črno-belo in rjavo pasmo nismo pričakovali razlik, saj je večina živali obej pasem v mlečni usmeritvi, kar pomeni, da na kmetijah

večinoma ni prisotnih spolno zrelih bikov pitancev. Glede na to, da smo po letu 2012 začeli natančneje preverjati reje, v katerih so neujemanja bolj verjetna (v izboru smo se bolj osredotočili na reje, kjer rejci osemenjujejo sami in na reje, kjer je možnost zamenjave teličke po rojstvu večja), se odstotek neujemanj pri črno-beli in rjavi pasmi pričakovano ni zmanjševal tekom let, ampak je ostal na podobnem deležu.

Pričakovali smo velike razlike v deležu neujemanj z očeti in v deležu neujemanj z materami, saj je znano, da je identiteta očeta pogosteje vprašljiva kot identiteta matere. V poreklih, kjer se neujemanje pojavlja pri obeh starših hkrati, je lahko prišlo do zamenjave teleta ob rojstvu oziroma je bilo tele pripisano napačni kravi, zato smo se po letu 2014 v naključnem izboru pri preverjanju porekla bolj osredotočili na velike reje, kjer je možnost zamenjave po materini strani večja. V teh primerih ni bilo moč izključiti možnosti, da je kontrolor/-ka vzec napačnemu teletu.

V primerih, ko krave telijo v skupinskem boksu v krajšem časovnem obdobju, je včasih nemogoče ugotoviti, kateri kravi pripada tele. Ta možnost obstaja prav tako v vezani rejji, kjer se novorojeno tele lahko »prisesa« drugi kravi, ki je telila v istem dnevu ali celo v obdobju nekaj dni. Ugotovili smo, da so pogoste tudi zamenjave telet, ki so rojena v obdobju do enega tedna. Imetnik govedi (rejec) je dolžan poskrbeti za pravočasno označitev telet na rojstnem gospodarstvu. Tele mora biti označeno čim prej po rojstvu oziroma pred premikom na drugo lokacijo, najkasneje pa do starosti 20 dni. Najkasneje v sedmih dneh od označitve mora imetnik registrirati tele v Centralni register govedi (CRG) ter vpisati rojstvo v Register govedi na gospodarstvu (RGG) (UL RS, 2003b). Ker se pogoste zamenjave zgodijo v obdobju prvega tedna po rojstvu, sklepamo, da si rejci ne zapisujejo dovolj natančno, katero tele pripada kateri kravi. V primeru, ko v čredi osemenjujejo krave z manjšim številom bikov, je možno, da se oče kljub zamenjavi teličke, ki jo pripšejo napačni kravi, ujema.

Pričakovali smo tudi razlike glede na način uporabe plemenskega bika (osemenjevanje, pripust). Pri bikih v pripstu smo pričakovali večji delež neujemanj kot pri bikih v osemenjevanju, ker je možnost nadzora manjša v primerjavi z osemenjevanjem. Z analizo porekel potomk bikov v pripstu smo hipotezo ovrgli, saj razlike niso bile statistično značilne zaradi premajhnega števila opazovanj.

Glede na izvor plemenskega bika nismo pričakovali razlik, saj naj bi se seme domačih plemenskih bikov ne razlikovalo od semena uvoženih bikov. Z analizo smo ovrgli zastavljeno hipotezo, saj je bil delež neujemanj v poreklih pri domačih bikih 4,391 večji od deleža neujemanj pri tujih bikih (10,6 % proti 2,6 %). Razlike v pravilnosti porekel med domačimi in tujimi plemenskimi biki lahko delno pripisemo temu, da rejci in osemenjevalci pri uporabi uvoženega semena z večjo natančnostjo beležijo osemenitve.

Na velik delež napak v poreklu potomk bikov v osemenjevanju ter na velik delež napak v poreklu potomk domačih bikov v primerjavi s tujimi so v preučevanem obdobju vplivale sistematične napake. Obrazložene so v poglavju »Vzroki za velik delež neujemanj pri lisasti pasmi«, zato bi bilo smiselno analizo neujemanj v poreklu glede na izvor in način uporabe bika ponoviti v drugih časovnih okvirih.

5.1.2 Delež neujemanj v poreklih v Sloveniji v primerjavi s tujimi viri

Delež neujemanj v poreklu goveda v Sloveniji v letih 2010–2014 pri vseh pasmah skupaj (11,6 %) je bil primerljiv z rezultati preverjanj porekla v populacijah črno-bele pasme, kjer je bil delež neujemanj 11,7 % v Izraelu (Weller in sod., 2004), 10,73 % na Češkem (Rehout in sod., 2006) ter 12 % do 15 % na Novi Zelandiji (Spelman, 2002; cit. po Carolino in sod. 2009). V letu 2013 so bili v populaciji goveda v Sloveniji rezultati bistveno boljši (v povprečju 8,4 % neujemanj) od rezultatov, ki jih navajajo omenjeni raziskovalci. Pri posamezni pasmi (5,6 % pri rjavi) smo dosegli raven neujemanj, ki je primerljiva z odstotkom neujemanj v poreklih pri črno-beli pasmi v Turčiji (4,7 %) (Ozkan in sod., 2009).

Pri primerjavi rezultatov preverjanja porekla z drugimi študijami je bilo treba upoštevati lastnosti vzorčne populacije. Testi v različnih populacijah kažejo delež neujemanj od 4,7 % v Turčiji (Ozkan in sod., 2009) do 35 % v Iranu (Hashemi in sod., 2013) oziroma celo 36 % pri pasmi gir v Braziliji (Baron in sod., 2002). Tu gre poleg razlik v heterogenosti populacije tudi za razlike v kriterijih vrednotenja rezultatov. V testu pasme gir, kjer je bil odstotek neujemanj 36 % (Baron in sod., 2002), so poreklo ovrgli že na podlagi neujemanja na enem mikrosatelitnem lokusu. Drugi raziskovalci

(Visscher in sod., 2002) so ugotovili veliko neujemanj pri označevalcu TGLA53 in ga izločili iz analize. Označevalec je znan kot zelo polimorfen in ima tudi v naši študiji najvišjo oceno za verjetnost izključitve.

V naših rezultatih, ki se nanašajo na potomke iz pripusta, smo prav tako kot Carolino in sod. (2009) dobili večji odstotek neujemanj z materami v primerjavi z očeti v pripustu. Carolino in sod. (2009) so pri mesnih pasmah na Portugalskem, ki so rejene v ekstenzivnih pogojih in kjer prevladuje pripust, ocenili največji delež neujemanj zaradi napačno zabeleženih mater (14 %), sledili so neustrezni očetje (7 %) in neustreznega oba starša (2 %). Izvor neujemanj so pripisali predvsem neustreznemu evidentiranju telitev, na drugem mestu pa so bila neujemanja zaradi napačno določenega očeta, ker je bilo v čredi hkrati prisotnih več plemenskih bikov.

5.1.3 Vzroki za velik delež neujemanj pri lisasti pasmi

Velik delež neujemanj v poreklih v letih 2010 in 2011 je bil predvsem na račun bikov lisaste pasme. V osemenjevalnem centru A pridobivajo le seme mladih bikov lisaste pasme, ki je namenjeno testiranju, potem pa jih uhlevijo v osemenjevalni center B, kjer se vrši distribucija semena že testiranih bikov in deloma tudi mladih bikov (Logar in Opara, 2011).

Z raziskavo, ki smo jo opravili v letu 2012, smo ugotovili razlog za velik odstotek neujemanj podatkov v poreklu pri lisasti pasmi in križankah lisaste pasme z RH in MB. Logar (2013) je ugotovila, da je šlo za napake v osemenjevalnem centru A, najverjetneje pri odvzemuh semena v tem osemenjevalnem centru, v obdobju 2008–2010. To smo ugotovili iz analize porekel po očetih, kjer smo pri posameznih plemenskih bikih ugotovili zelo velike deleže neujemanj s potomkami. Zelo je izstopal plemenski bik LS I (za namen naloge je uvedena interna oznaka), ki je imel največ (83 %) neujemanj s potomkami. Pri ponovni analizi iz drugega vzorca semena tega bika, pridobljenega na isti lokaciji, se rezultati niso ujemali z rezultati prvega vzorca semena. Pridobili smo še vzorec njegove dlake in semena, pridobljenega na osemenjevalnem centru B. Rezultati teh dveh vzorcev so bili identični rezultatom za drugi vzorec semena iz osemenjevalnega centra A. S temi ugotovitvami smo potrdili

domnevo, da je na distribucijskem centru A prišlo do občasnih zamenjav bikov in posledično za napako pri pakiranju semena (Logar, 2013).

V pomoč nam je bil primer v čredi, kjer je bilo pri treh potomkah sporno očetovstvo s plemenskim bikom LS II. Vse slamice so bile iz iste serije, kar pomeni, da so bile odvzete isti dan (Logar, 2013). Poreklo vseh treh potomk se je ujemalo z bikom LS III, vse tri potomke pa so imele tudi znane podatke o materah, ki so zagotavljale še večjo zanesljivost testa. S pomočjo številke o seriji semena in premikov smo ugotovili, da sta bila bika sočasno prisotna na osemenjevalnem centru A in da je bilo sočasno uhlevljenih še več bikov, z večjim številom neujemanj s potomkami.

Pri plemenskem biku LS IV smo s pomočjo mikrosatelitnih označevalcev ugotovili prisotnost semena več kot enega bika v eni slamici, oziroma t. i. mešano seme. Žal se na potrdila o osemenitvi krav pogosto ne vpisuje serij semena (ali pa zapis ni pravilen), zato je sledenje semenu praktično nemogoče in je možnost ugotavljanja pravega starša zelo majhna. S pomočjo poizvedbe v programskemu jeziku SQL lahko vsakemu potomcu, ki ima podatke o genotipu, najdemo nabor ustreznih očetov, ki je ob pogoju, da poznamo mater (ki se s potomcem ujema), toliko ožji. Za potrjevanje starševstva to žal ni dovolj, obstajati mora še dodaten dokaz, kot je na primer shranjena slamica ali zapis na osemenjevalnem listku (v primeru dvojnih osemenitev ali napačno prepisanega imena ali številke bika). Rejcem priporočamo shranjevanje praznih slamic po osemenitvi pri vsaki kravi v čredi.

5.2 POPULACIJSKA ANALIZA

Slovenska populacija črno-bele pasme z opaženo heterozigotnostjo 0,73 in povprečnim številom alelov na lokus 9,5 je bila primerljiva s populacijo črno-bele pasme na Nizozemskem ($H_o=0,72$) (van de Goor in sod., 2011), povprečno število alelov na lokus pa je bilo v njihovi populaciji nekoliko manjše (7,8). Populacijske parametre so ocenjevali z enakim nizom mikrosatelitnih lokusov kot v naši študiji, vzorčne živali pa niso bile naključno izbrane iz populacije. Opažena heterozigotnost pri drugih pasmah iz študije na Nizozemskem je bila med 0,55 in 0,75, povprečno število alelov na lokus pa med 4,3 in 9,3. Simčič in sod. (2008) so v populaciji

cikastega goveda v Sloveniji določili opaženo heterozigotnost, ki je bila manjša pri ciki (0,74) v primerjavi z bušo (0,78). Parametre genetske pestrosti so (Simčič in sod., 2013) ocenjevali tudi ločeno glede na tip cikastega goveda (cikasti, delno cikasti in pincgavski tip) in dobili vrednosti za opaženo heterozigotnost, ki so bile pri cikasti in delno cikasti pasmi manjši (0,70 in 0,67) od H_o v naši študiji in pri pincgavskem tipu večje (0,76) od vrednosti v naši študiji. S primerjavo opažene in pričakovane heterozigotnosti smo določili tudi, da je populacija v ravnotežju. To pomeni, da proučevane pasme ohranjajo obstoječo genetsko pestrost.

5.3 DOLOČITVENI TESTI

Van de Goor in sod. (2011) poročajo, da je uspešnost določitvenega testa po Bayesovem prostopu, ki so jo dobili v študiji na 20 pasmah govedi s 16 mikrosatelitnimi lokusi, zagotavlja dovolj informacij za forenzične analize pri nekaterih izmed proučevanih pasem. Med njimi je bila tudi holštajnska pasma, niso pa analizirali rjave in lisaste pasme. Pasemska pripadnost so v povprečju pravilno določili 88,2 % osebkom.

V našem delu smo pričakovali, da se bodo glavne pasme govedi (rjava, lisasta in črnobela) v Sloveniji med seboj genetsko razlikovale in da se bo določevanje pasme na osnovi mikrosatelitov izkazalo za uspešno. V skladu z našimi pričakovanji je genetska struktura populacije s programom STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) sovpadala s pasemske strukturo iz podatkov o poreklu goveda. S programom GeneClass2 (Piry in sod., 2004) smo uspešno določili pripadnost živali posamezne pasme na podlagi genotipa. Ker so se proučevane čiste pasme pri uporabljenih 12 označevalcih med seboj dovolj genetsko razlikovale (F_{ST} med 0,075–0,095), smo lahko dosegli zelo dobre rezultate določitvenega testa, vendar je bila zanesljivost določitvenega testa nekoliko premajhna. V naši populaciji bi bilo smotrno uporabiti razširjen niz 16 mikrosatelitov, ki ga predlagajo van de Goor in sod. (2011), da bi izboljšali zanesljivost določitvenega testa za forenzične namene.

Dalvit in sod. (2008a) so z izbranim nizom označevalcev dosegli zelo dobre rezultate določitvenega testa, celo samo s šestimi označevalci, vendar je bila zanesljivost

določitvenega testa nezadovoljiva. Raziskave kažejo, da če želimo razlikovati med zelo sorodnimi pasmami, se moramo osredotočiti na odkrivanje označevalcev, ki omogočajo odkrivanje prisotnosti privatnih alelov (Dalvit in sod., 2008a).

Podobne rezultate, kot smo jih dobili v naši študiji, so dobili tudi Maudet in sod. (2002), ki so pri sedmih francoskih pasmah goveda in ene tuje (holštajn) z neposrednim testom (Paetkau in sod., 1995) na 23 mikrosatelitnih lokusih uspešno določili pasmo posamezni živali z verjetnostjo med 92,7 % pri pasmi abundance in 100 % pri pasmi holštajn. Pasma holštajn je bila genetsko najbolj različna od ostalih pasem, zato so bili rezultati določitvenega testa pri tej pasmi najboljši. S testom izključitve na podlagi simulacije (Curnet in sod., 1999) so lahko posamezni živali dodelili izvorno populacijo (pasma) glede na različne pragove zaupanja. Pri $p < 0,05$ so pravilno določili od 51,6 % živali pasme villard de lans in do 90,2 % živali pasme holštajn. Pri višji ravni zanesljivosti se je uspešnost določevanja pasme posameznega osebka zmanjševala in je bila pri $p < 0,001$ glede na pasmo med 6,5 % in 78,4 %.

Dalvit in sod. (2008a) so z uporabo 21 mikrosatelitnih lokusov pri štirih pasmah italijanskega goveda (chianina, marchigiana, romagnola in piemontese) po metodi največje verjetnosti (brez p-vrednosti) določili pasmo posameznega osebka z uspešnostjo med 83,3 % in 100 %. Z metodo določitvenega testa, ki temelji na Bayesovem principu, pri $p < 0,01$ ni bila nobenemu osebku pravilno določena pasma, pri $p < 0,1$ pa je bilo pravilno določenih zgolj 52,5 % osebkov. Slab rezultat določitvenega testa je bil predvsem posledica majhnega genetskega razlikovanja med pasmami ($F_{ST} = 0,049$).

5.4 KAKŠNE MOŽNOSTI NAM PONUJAJO REZULTATI GENOTIPIZACIJE Z MIKROSATELITI NA PODROČJU GOVEDOREJE

V skladu z zakonodajo EU (uredbi ES 1760/2000 in 1825/2000) morajo nosilci dejavnosti in organizacije, ki tržijo goveje meso, na etiketi dodatno navesti podatke o poreklu, zlasti kje se je žival ali so se živali, iz katerih izhaja goveje meso, rodile, pitale in zaklale. Izbrani niz označevalcev se lahko uporablja za sledljivost živali ali

živalskih proizvodov, npr. klavni kosi, zarodki, seme, vzorci mleka od posamezne živali. Poleg sledljivosti posamezne živali je potrditev pasme posebnega pomena pri tradicionalnih mesnih in mlečnih izdelkih, ki so proizvod več kot ene živali iste pasme. Na primer mleko večjega števila krav določene pasme se uporablja za proizvodnjo sira. Mogoče je izračunati frekvence alelov iz skupnega vzorca DNA (Schnack in sod., 2004) in jih primerjati z znanimi frekvencami alelov pasme. Tak preizkus bi omogočil spremeljanje porekla zaščitenih tradicionalnih živilskih proizvodov.

5.5 PRIČAKOVANI PRISPEVEK MAGISTRSKE NALOGE K RAZVOJU GOVEDOREJE

Pričakujemo, da se bodo pozitivni učinki natančno vodenega porekla odražali na uspešnejšem selekcijskem delu, to je večjem genetskem napredku, pri čemer je pomemben prispevek dela tudi v nadzoru nad inbridingom in preprečevanjem parjenja v ožjem sorodstvu. Rezultati genotipizacije, ki smo jih pridobili za potrebe preverjanja porekla, nam bodo omogočili izračunavanje še drugih populacijskih parametrov, kot sta efektivna velikost populacije in povprečni generacijski interval. Omogočili nam bodo primerjalne študije med različnimi pasmami in populacijami goveda za ugotavljanje filogenetskih odnosov in za potrebe ohranjanja genetskih virov ter spremeljanja pasemske sestave.

6 SKLEPI

- V populaciji goveda v kontroli porekla in prireje v Sloveniji v letih 2010–2014 je bil skupni delež neujemanj (oče, mati, oba starša) v skladu z našimi pričakovanji (11,6 %). Kot smo pričakovali, je bil največji odstotek neujemanj v podatkih o poreklu teličk lisaste pasme (16,7 %), kjer smo ugotovili značilen trend zmanjševanja ovrženih porekel za 0,704 na leto. Med teličkami rjave in črno-bele pasme ni bilo statistično značilnih razlik v skupnem deležu neujemanj.
- Delež neujemanj z očeti je bil 11,6 krat večji od deleža neujemanj z materami.
- Analiza rezultatov preverjanja porekla glede na način uporabe bikov je pokazala, da med očeti, ki so bili v pripustu, in očeti v osemenjevanju ni statistično značilnih razlik.
- Analiza rezultatov preverjanja porekla glede na izvor plemenskih bikov je pokazala, da je bilo pri uvoženih bikih 4,391-krat manj neujemanj glede na domače plemenske bike.
- Z analizo s programom STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) smo pojasnili genetsko strukturo populacije s tremi skupinami, ki ustrezajo trem pasmam (črno-bela, lisasta in rjava), genetski ustroj križank lisaste pasme z RH in MB pa je ustrezal lisasti pasmi z manjšim deležem črno-bele pasme.
- S programom GeneClass2 (Piry in sod., 2004) smo lahko z določitvenim testom z najmanj 98,2 % uspešnostjo določili pasemsко pripadnost čistopasemskih teličk na podlagi podatkov izbranega niza mikrosatelitnih označevalcev. S testom izključitve na podlagi simulacije pa je bila največja uspešnost 81,4 % in se je s povečevanjem ravni zanesljivosti zmanjševala.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Pri govedu je preverjanje porekla z uporabo molekularnogenetskih označevalcev pomembno predvsem zaradi ekonomske vrednosti plemenskih živali in načina testiranja živali, kjer lastnosti bikov ocenujemo na podlagi velikega števila potomk. Napake v rodovniku vodijo v napake pri oceni plemenskih vrednosti, pri čemer je lahko negativna posledica tudi parjenje v ožjem sorodstvu.

Določili smo genotipe 3404 naključno izbranih teličk in njihovih staršev z nizom 12 mikrosatelitnih označevalcev. DNA teličk in njihovih mater smo izolirali iz dlačnih mešičkov, DNK očetov pa iz vzorcev semena in dlake. Analizo dolžin mikrosatelitov smo izvedli z genetskim analizatorjem ABI3130xl z uporabo GeneMapper programske opreme. Mikrosateli, ki smo jih v našem delu uporabili, so bili pri vseh pasmah visoko polimorfni in so imeli v povprečju od 7,2 do 9,6 alelov na lokus. Zbrane podatke smo obdelali z modelom logistične regresije s proceduro LOGISTIC, kot optimizacijsko metodo smo uporabili Newton-Raphson. Analize smo izvedli s statističnim paketom SAS/STAT (SAS Institute Inc., 2011).

Največji delež neujemanj v poreklu v obdobju od 2010 do 2014 je bil pri lisasti pasmi (16,7 %), najmanjši pa pri rjavi pasmi (5,6 %). Pri lisasti pasmi je bil statistično značilen trend zmanjševanja števila napak v poreklu po letih za faktor 0,704, pri križankah lisaste pasme z RH in MB pa za 0,780. Pri rjavi in črno-beli pasmi nismo zaznali spremenjanja verjetnosti ovrženega porekla po letih, vendar je bil pri teh dveh pasmah delež ovrženih porekel ves čas pod 10 %. Največje razlike v verjetnosti, da je bilo poreklo ovrženo, so bile med lisasto in rjavo pasmo ter lisasto in črno-belo pasmo v letih 2010, 2011 in 2012. Lisasta pasma je imela v letu 2010 kar 6,854-krat večji obet za napake v poreklu v primerjavi z rjavo pasmo in 3,998-krat večji obet za napake glede na črno-belo pasmo. Velik delež neujemanj pri lisasti pasmi lahko pripisemo mladim bikom, ki so bili na odvzemenu semenu v osemenjevalnem centru A v obdobju 2008–2010. V skladu z našimi pričakovanji je bilo med podatki o očetovstvih več neujemanj kot podatki o materinstvih. Med očeti, ki so bili v pripustu, in očeti v

osemenjevanju ni bilo statistično značilnih razlik v pravilnosti porekla potomk. Pri uvoženih plemenskih biki je bilo 4,391-krat manj neujemanj s potomkami glede na domače plemenske bike.

Z analizo, izvedeno s programom STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), smo pojasnili genetsko strukturo 1474 teličk s predpostavko treh skupin, ki ustrezajo trem pasmam (črno-bela, lisasta in rjava), genetski ustroj križank lisaste pasme z RH in MB pa je ustrezaš lisasti pasmi z manjšim deležem črno-bele pasme. Glavne pasme goveda (rjava, lisasta in črno-bela) v Sloveniji so se med seboj genetsko razlikovale (F_{ST} med 0,0756–0,0953). Na podlagi genotipov smo z neposrednim določitvenim testom z računalniškim programom GeneClass2 (Piry in sod., 2004) več kot 98,2 % čistopasemskih teličk uvrstili v pasmo, ki ustreza rodovniku in fenotipu. S testom izključitve na podlagi simulacije, pa smo 81,4 % teličk lisaste pasme in 81,2 % teličk črno-bele pasme ($p < 0,05$) uvrstili v pasmo, ki ustreza rodovniku in fenotipu, pri čemer smo jih izključili iz vseh drugih pasem (populacij). V naši populaciji bi bilo smotrno preveriti tudi razširjen niz 16 mikrosatelitov, da bi izboljšali zanesljivost določitvenega testa.

Zaključimo lahko, da je bil z uvedbo naključnega preverjanja porekla pri govedu v Sloveniji narejen pomemben korak k izboljšanju kakovosti dela na področju rodovništva.

7.2 SUMMARY

Pedigree verification in cattle breeding using molecular genetic markers is important primarily because breeding animals have high economic value and the testing method for the bulls is progeny testing. Pedigree errors lead to errors in the estimation of breeding values, which may also result in breeding between relatives.

The genotypes of 3,404 randomly selected female calves and their parents were determined using a set of 12 ISAG microsatellite markers. The DNA of calves and their mothers was isolated from the hair follicles, and the DNA of the sires was isolated from semen samples and hair follicles. The length of microsatellites was determined on genetic analyser ABI3130x1 using GeneMapper software. The 12 microsatellites were polymorphic in all breeds and had from 7.2 to 9.6 alleles per locus. Analysis of factors influencing pedigree errors was performed using a logistic regression model with the LOGISTIC procedure in the statistical package SAS/STAT.

We found that the proportion of mismatches, which was the largest in the Simmental breed (16.7 %), decreased by a factor of 0.704 over the years in the study. Compared to the Brown breed, in 2010, Simmental had a 6.854x higher chance for pedigree error, whereas, after 2012, there was no statistically significant difference in the proportion of pedigree errors among different breeds and crosses. A large proportion of mismatches within the Simmental breed can be attributed to the young bulls located at insemination centre A in the period 2008–2010. There is no clear trend in the reduction of discarded pedigrees over the years with Brown and Holstein breeds. Nevertheless, they both have a share of discarded pedigrees consistently below 10 %. As expected, the percentage of discrepancies was higher for paternity data than maternity data. The exception was natural breeding where the calves' mothers were more often erroneously recorded as being the father. There were no significant differences in pedigree errors between sires that were used for natural service and sires that were used for artificial insemination. Imported breeding bulls had 4,391 times less discrepancies with their offspring compared to domestic breeding bulls.

Analysis performed using the STRUCTURE program (Pritchard et al., 2000) revealed the genetic structure of 1,474 calves by setting up three groups corresponding to the three breeds (Holstein, Simmental, and Brown). Genetic makeup of crossbreeds with Simmental corresponded to the Simmental breed with a smaller proportion of the Holstein breed. The three breeds of cattle (Holstein, Simmental, and Brown) in Slovenia were identified as genetically differentiated (F_{ST} between 0.076 and 0.095). Results from the direct assignment test using the GeneClass2 (Piry in sod., 2004) program revealed that, in purebreds, more than 98.2 % of animals were assigned to the correct breed. The exclusion-simulation significance test correctly assigned 81.4 % of Simmental calves and 81.2 % of Holstein calves ($p < 0.05$) to the breed concordant with their pedigree and phenotype data. Further on, the test excluded them from all other breeds (populations). It would be prudent to use an expanded set of 16 microsatellites in our population in order to improve the reliability of the designation test.

We conclude that an important step has been made with the introduction of random verification of cattle pedigrees in Slovenia, resulting in improving the quality of work in the field of pedigree records.

VIRI

- Banos G., Wiggans G.R., Powell R.L. 2001. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. *Journal of Dairy Science*, 84,11: 2523-2529
- Barendse W., Armitage S., Kossarek L., Shalom A., Kirkpatrick B., Ryan A., Clayton D., Li L., Neiberger H.L., Zhang N., Grosse W.M., Weiss J., Creighton P., McCarthy F., Ron M., Teale A.J., Fries R., McGraw R.A., Moore S.S., Georges M., Soller M., Womack J.E., Hetzel D.J.S. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics*, 6: 227-235
- Baron E. E., Martinez M. L., Verneque R. S., Coutinho L. L. 2002. Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 4: 389-394
- Bishop M.D., Kappes S. M., Keele J. W., Stone R. T., Sunden S.L.F., Hawkins G. A., Toldo S. S., Fries R., Grosz M. D., Yoo J., Beattie C. W. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136: 619-639
- Bovine genome project. 2006. Bovine Whole Genome Assembly release Btau_3.1. Houston, Baylor College of Medicine - Human Genome Sequencing Center: 3 str. <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/> (6.10.2015)
- Carolino I., Sousa C.O., Ferreira S., Carolino N., Silva F. S., Gama L.T. 2009. Implementation of a parentage control system in Portuguese beef-cattle with a panel of microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, 32: 306–311
- Cassell C.G. 1999. Inbreeding in Dairy Cattle. The dairy site. Virginia, Virginia Polytechnic Institute and State University: 4 str. <http://www.thedairysite.com/articles/698/inbreeding-in-dairy-cattle/> (6.10.2015)
- Cattle Molecular Markers and Parentage Testing Workshop. 2008. ISAG Conference, Amsterdam, The Netherlands, 20. - 24. 2008: 3 str. (http://www.isag.us/Docs/ISAG2008_CattleParentage.pdf) (6.10.2015)
- Cattle Molecular Markers and Parentage Testing Workshop. 2010. ISAG Conference, Edinburgh, Scotland, 26.-30.6.2010: 3 str. (http://www.isag.us/Docs/CattleMMPTest_CT.pdf) (6.10.2015)
- Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153:1989–2000
- Dalvit C., De Marchi M., Dal Zotto R., Gervaso M., Meuwissen T., Cassandro M. 2008a. Breed assignment test in four Italian cattle breeds. *Meat Science*, 80: 389–395

- Dalvit C., De Marchi M., Targhetta C., Gervaso M., Cassandro M. 2008b. Genetic traceability of meat using microsatellite markers. *Food Research International*, 41: 301–307
- Dodds, K.G., Tate, M.L., McEwan, J.C., Crawford, A.M. 1996. Exclusion probabilities for pedigree testing farm animals. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 966-975
- Dovč P., 1994. Tipiziranje DNK kot metoda za preverjanje porekla živali. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, Zootehnika, Suplement* 64: 45-56
- Dovč P. 1998. Genetsko kartiranje evkariontskih genov. *Proteus*, 61, 4: 163-171
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 8: 2611-2620
- Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. 2nd ed. Cambridge, Cambridge University Press: 618 str.
- Georges M., Massey J. 1992. Polymorphic DNA markers in Bovidae. World Intellectual Property Organization. Geneva Patent application PAT - WO9213102
- Goldstein D., Schlötterer C. 1999. *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford, Oxford University Press: 368 str.
- Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 6: 485-486
- Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewotin R.C., Gelbart W.M., Suzuki D.T., Miller J.H. 2004. *Introduction to genetic analysis*. 8th ed. New York, WH Freeman & Co.: 800 str.
- Hashemi M., Amirinia C., Harkinezhad T., Bonabazi M. H., Javanmard A., Amiri F. 2013. Validation of pedigree relationships using a multiplex microsatellite marker assay in iranian holstein cattle. *Annals of Animal Science*, 13, 3: 481-493
- ICAR rules and guidelines for accreditation of DNA paternity testing in cattle. 2015. Proceedings of the ICAR Technical Meeting held in Krakow, Poland, 10.-12.6.2015: 9 str.
<http://www.icar.org/Documents/Rules%20and%20regulations/Guidelines/Krakow%2015/Parentage%20Recording.pdf> (17.12.2015)
- Israel C., Weller J. I. 2000. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. *Journal of Dairy Science*, 83, 1: 181-187

- Jamieson A. 1994. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics* 25, Supplement 1: 37–44
- Kavar T., Dovč P. 1999. Uporaba mikrosatelitov za opis genetske raznolikosti. *Sodobno kmetijstvo*, 32, 6: 290-292
- Kavar T. 2001. Ocena genetske raznolikosti v populaciji konj lipicanske pasme. Doktorska disertacija. Domžale, Biotehniška fakulteta: 118 str.
- Klinkon Z. 2015. Vloga za spremembo rejskega programa za cikasto govedo. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Radomlje, Združenje rejcev avtohtonega cikastega goveda v Sloveniji: 3 str. (interni gradivo)
- Logar B., Podgoršek P., Jeretina J., Ivanovič B., Perpar T. 2005. Online-available milk-recording data for efficient support of farm management. V: Kuipers A., Klopčič M., Cled T. (eds.). Knowledge transfer incattle husbandry : new management practices, attitudes and adaptation, (EAAP publication, 117). Wageningen, Wageningen Academic Publishers: 227-230
- Logar B., Opara. A. 2011. Naključno preverjanje porekla. V: Poročilo o izvajanju strokovnih nalog v govedoreji za leto 2010 na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Perpar T. (ur). Ljubljana, Kmetijski Inštitut Slovenije: 17-20
- Logar B. 2013. Analiza laboratorijskega preverjanja porekla živali. V: Poročilo o izvajanju strokovnih nalog v govedoreji za leto 2012 na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Perpar T. (ur). Ljubljana, Kmetijski Inštitut Slovenije:18-24
- Maudet C., Luikart G., Taberlet P. 2002. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science*, 80: 942–950
- Ozkan E., Soysal M. I., Ozder M., Koban E., Sahin O., Togan I. 2009. Evaluation of parentage testing in the Turkish Holstein population based on 12 microsatellite loci. *Livestock Science*, 124: 101–106
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., and Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* 4:347–354
- Perpar T., Sadar M., Logar B., Podgoršek P., Jeretina J., Jenko J., Opara. A. 2015. Strokovna pravila in opis metod za izvajanje nekaterih nalog rejskih programov pri govedu. Dopolnjena izd. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije, Druga priznana organizacija v govedoreji: 75 str. https://www.govedo.si/files/cpzgss/knjiznica/RP/STROKOVNA%20PRAVILA_2010_dopolnitev_1.pdf (28.6.2016)
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Paetkau D., Baudouin L., Estoup, A. 2004. GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, 95: 536-539

Pravilnik o poreklu za čistopasemske plemenske govedo, bikovo seme, jajčne celice in zarodke. 2003. Uradni list RS, 94: 13575

Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959

Rehout V., Hradecká E., Čítek J. 2006. Evaluation of parentage testing in the Czech population of Holstein cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 51: 503–509

Sadar M., Jenko J., Jeretina J., Logar B., Perpar T., Podgoršek P. 2015. Rezultati kontrole mleka in mesa 2014. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 89 str.

SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Software, Version 9.3. Cary, NC

Shackell G.H., Tate M.L., Anderson R.M. 2001. Installing a DNA-based traceability system in the meat industry. *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics*, 14: 533–536

Simčič M., Čepon M., Horvat S., Jovanovac S., Gantner V., Dovč P., Kompan D. 2008: Genetic characterisation of autochthonous cattle breeds Cika and Busha using microsatellites. *Acta agriculturae Slovenica*, 92: 71-77

Simčič M., Lenstra J.A., Baumung R., Dovč P., Čepon M., Kompan D. 2013. On the origin of the Slovenian Cika cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 130: 487–495

Simcic M., Smetko A., Sölkner J., Seichter D., Gorjanc G., Kompan D., Medugorac I. 2015. Recovery of native genetic background in admixed populations using haplotypes, phenotypes, and pedigree information – using Cika cattle as a case breed. *PLoS ONE*, 10, 4: e0123253, doi:10.1371/journal.pone.0123253: 20 str.

Steffen P., Eggen A., Dietz A.B., Womack J.E., Stranzinger G., Fries R. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics*, 24: 121-124

Sunden S.L.F., Stone R.T., Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Beattie C.W. 1993. A highly polymorphic bovine microsatellite locus: BM2113. *Animal Genetics*, 24: 69-69

Toldo S. S., Fries R., Steffen P., Neiberg H. L., Barendse W., Womack J. E., Hetzel D. J. S., Stranzinger G. 1993. Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mammalian Genome*, 4: 720-727

Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi K., Eggen A., Ciampolini R., Lépingle A., Velmala R., Kaukinen J., Varvio S-L., Martin P., Levéziel H., Guérin G. 1994. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome*, 5: 288-297

- van de Goor L.H.P., Koskinen M.T., van Haeringen W.A. 2011. Population studies of 16 bovine STR loci for forensic purposes. International Journal of Legal Medicine, 125: 111–119
- Visscher P. M., Wooliams J. A., Smith D., Williams J. L. 2002. Estimation of pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite markers and the impact on selection. Journal of Dairy Science 85, 9: 2368-2375
- Weir B.S., Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38, 6: 1358-1370
- Weller J.I., Feldmesser E., Golik M., Tager-Cohen I., Domochovsky R., Alus O., Ron M. 2004. Factors affecting incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein population. Journal of Dairy Science, 87: 2627-2640
- Wright S. 1950. Genetical structure of populations. Nature, 166: 247–249
- Žan Lotrič M., Čepon M., Kompan D., Klinkon Z., Rokavec R., Jeretina J., Logar B., Mrkun J., Burja A. 2010. Rejski program za cikasto govedo : dopolnjen v skladu s pripombami MKGP z dne 27.09.2010. Mengeš, Govedorejska zadruga: 83 str.

ZAHVALA

Najlepše bi se zahvalila mentorju prof. dr. Petru Dovču za pregled in kritično presojo magistrskega dela.

Zahvaljujem se predsedniku komisije prof. dr. Simonu Horvatu ter članicama prof. dr. Mileni Kovač in dr. Marjeti Čandek Potokar za pregled in popravke magistrske naloge.

Zahvaljujem se asist. Tini Flisar za pomoč pri statistični obdelavi podatkov o preverjanju porekla.

Zahvaljujem se mag. Simoni Juvan za hiter pregled oblikovne ustreznosti naloge.

Za nesebično pomoč in vrsto uporabnih nasvetov bi se najiskreneje zahvalila dr. Andreju Razpetu, dr. Betki Logar, doc. dr. Mojci Simčič, dr. Ilji Gasanu Osojniku Črnivcu in Jani Obšteter.

Hvala mojemu možu in družini za vso pomoč, potrežljivost in podporo.