

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Tomaž VOLČIČ

**PREVERJANJE POREKLA PRI OVCAH Z UPORABO
MOLEKULARNIH GENETSKIH OZNAČEVALCEV**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**MOLECULAR GENETICS MARKERS USED TO VERIFY SHEEP
PEDIGREE**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek visokošolskega študija kmetijstvo – zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo, imunologijo, splošno živinorejo in konjerejo, Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so bile v genetskem laboratoriju opravljene vse analize.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala prof.dr. Simona Horvata in kot somentorja doc.dr. Dragomirja Kompana.

Recenzent: prof.dr. Peter DOVČ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc.dr. Stanko KAVČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof.dr. Simon HORVAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter DOVČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc.dr. Dragomir KOMPAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tomaž VOLČIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Vs
DK	UDK 636.3:575(043.2)=163.6
KG	ovce/poreklo/molekularna genetika/genetski označevalci
KK	AGRIS L10/5240
AV	VOLČIČ, Tomaž
SA	HORVAT, Simon (mentor)/ KOMPAN, Dragomir (somentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2007
IN	PREVERJANJE POREKLA PRI OVCAH Z UPORABO MOLEKULARNIH GENETSKIH OZNAČEVALCEV
TD	Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP	X, 59 str., 11 pregl., 22 sl., 7 pril., 27 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Poreklo ovc iz kontroliranih tropov je opisano z njihovim rodovnikom, zato je pravilnost rodovniških podatkov in zaupanje vanje bistvenega pomena za rejce ovc in učinkovito izvajanje selekcijskih programov. V prvem delu naloge smo preverili, če je možno s pomočjo molekularno genetskih označevalcev ter uporabo računalniškega programa ATLAS učinkovito ugotavljati poreklo v več-generacijskih rodovnikih slovenskih pasem ovc. Uporabili smo 8 mikrosatelitnih označevalcev (MAF214, OarCP49, OarFCB11, MAF65, TGLA53, McM42, OarAE119 in McM527) in preverili rodovniške podatke jagnjetom jezersko-solčavske (JS) in oplemenjene JS pasme, kjer je vsako jagnje imelo evidentirana oba starša. Ugotovitve raziskave so pokazale, da je bilo beleženje rodovniških podatkov pri populaciji ovc JS in JSR pasme pravilno v 90,9 %. Neskladja rodovniških podatkov smo po primerjavi rodovnika z rezultati genotipizacije opazili pri štirih družinah od 44-ih. V enem od štirih napačno vodenih rodovnikov je bil potomcu nepravilno pripisan oče, v drugem mati, za ostala dva primera pa smo ugotovili, da sta bila jagnjetu napačno pripisana oba starša. V drugem delu raziskave smo poskušali z istim nizom mikrosatelitnih označevalcev določiti očetovstva štirim jagnjetom istrske pramenke, kjer v času paritev v trop pripuščajo dvajset ovnov in tako jagnje nima poznane očeta. Rezultati primerjave genotipov so pokazali, da smo z osmimi mikrosatelitnimi označevalci trem jagnjetom od štirih lahko določili očeta z izločitvijo ostalih devetnajstih. V enem primeru smo ugotovili, da set osmih označevalcev ni dovolj informativen za določitev očeta potomcu, zato smo analizo razširili in in z vključitvijo dodatnih štirih mikrosatelitnih označevalcev uspešno določili očetovstvo tudi v tem primeru. Z izbranim nizom molekularnih označevalcev in obdelave podatkov je torej možno učinkovito preverjati obstoječe rodovniške podatke in napovedati očetovstvo jagnjetom v tropih, kjer pripuščajo večje število ovnov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 636.3:575(043.2)=163.6
CX sheep/pedigree/molecular genetics/genetic markers
CC AGRIS L10/5240
AU VOLČIČ, Tomaž
AA HORVAT, Simon (supervisor)/ KOMPAN, Dragomir (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljani, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
PY 2007
TI MOLECULAR GENETICS MARKERS USED TO VERIFY SHEEP PEDIGREE
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO X, 59 p., 11 tab., 22 fig., 7 ann., 27 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Pedigree data from recorded flocks are of importance for the proper flock management by breeders as well as for the selection programmes and accurate performance prediction. The first part of this thesis was set to examine if the use of molecular markers and computer analysis package ATLAS can be applied to verify known pedigrees (lambs with both known parents) of Jezersko-Solčava and Improved Jezersko-Solčava sheep breed. Eight microsatellite markers (MAF214, OarCP49, OarFCB11, MAF65, TGLA53, McM42, OarAE119 and McM527) were employed in this parentage test. For Jezersko-Solčava and Improved Jezersko-Solčava sheep breed 90.9 % of pedigree data were in concordance with molecular test data. In 4 out of 44 cases, one had a different father assigned in the pedigree data, one had a different mother and in the other two cases both parents were different from those assigned by our molecular test. In the second part of our research we aimed to determine the paternity to 4 lambs of Istrian Pramenka breed, in which a random mating scheme with 20 rams was used and hence the lambs had no father assigned. Using the same set of 8 microsatellite markers as above, we were able to determine paternity for 3 out of 4 lambs. In one case we established that a set of 8 markers was not informative enough but with inclusion of 4 more microsatellite markers, we successfully identified a father of this lamb as well. With the chosen set of microsatellite markers and data analysis programme we therefore established that it is possible to efficiently perform pedigree data validation as well as paternity prediction for lambs from flocks, where a large number of rams are used in a random mating system.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	II
Key words documentation (KWD)	III
Kazalo vsebine	IV
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 OPIS PASEM OVAC VKLJUČENIH V RAZISKAVO	2
2.1.1 Jezersko solčavska pasma	2
2.1.2 Istrska pramenka	3
2.1.3 Oplemenjena jezersko-solčavska pasma (JSR)	4
2.2 UPORABA GENETSKIH OZNAČEVALCEV ZA UGOTAVLJANJE POREKLA	5
2.2.1 Mikrosateliti	8
2.2.2 Preverjanje porekla živali	9
2.2.3 Mikrosatelitni lokusi pri ovcah in kozah	10
2.2.4 Uporaba DNA označevalcev za določitev očetovstva v čredah z več plemenskimi ovni	11
2.2.5 Multipleksiranje mikrosatelitov	13
2.2.6 Primerjava različnih tkiv za mikrosatelitno analizo DNA	14
2.3 GENETSKE RAZISKAVE NA PODROČJU OVČEREJE V SLOVENIJI	15
2.3.1 Genetske razlike med istrsko pramenko, bovško ovco in jezersko-solčavsko ovco	15
2.4 STRATEGIJA KONTROLE POREKLA DROBNICE V SLOVENIJI	18
2.4.1 Zapisovanje porodov in označevanje mladičev	19
2.4.2 Odbira in priznavanje plemenjakov	19
2.4.3 Izdaja »Izkaza o poreklu« (Rodovnika)	19
2.4.4 Sistem notranje kontrole	20

3 MATERIAL IN METODE	21
3.1 VZORČENJE	21
3.2 POSTOPKI V LABORATORIJU	22
3.2.1 Izolacija DNA iz ušesnega tkiva	22
3.2.2 Izolacija DNA iz krvi	24
3.2.3 Določanje koncentracije DNA in priprava delovnih raztopin	25
3.2.4 Izbira mikrosatelitov in začetnih oligonukleotidov	26
3.2.5 Verižna reakcija s polimerazo PCR (ang. <i>Polimerase chain reaction</i>)	27
3.2.6 Preverjanje PCR vzorcev na agarozni gelski elektroforezi	29
3.2.7 Genotipiziranje	30
3.2.8 Analiza genotipov z ATLASOM	32
3.2.9 Statistična analiza mikrosatelitnih podatkov	32
4 REZULTATI	34
4.1 GENOTIPIZIRANJE POSKUSNE POPULACIJE	35
4.1.1 Določanje velikosti mikrosatelitov na aparatu ABI PRISM™ 310	36
4.2 RODOVNIŠKA ANALIZA ZA JEZERSKO SOLČAVSKO IN OPLEMENJENO JS PASMO (ANALIZA POREKLA)	38
4.2.1 Živali s pravilnim rodovnikom	38
4.2.2 Neskladja testnih vzorcev	39
4.3 DOLOČANJE OČETOVSTVA ZA ISTRSKO PRAMENKO	41
4.3.1 Dodatni set mikrosatelitnih označevalcev za določitev očetovstva potomcu 11346	42
4.4 FREKVENCE ALELOV ZA POSAMEZNE MIKROSATELITNE LOKUSE PO PASMAH	44
4.5 INFORMATIVNOST IZBRANIH MIKROSATELITNIH OZNAČEVALCEV	46
4.5.1 Povprečna ocena informativnosti označevalcev za vse tri pasme	47
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	49
5.1 RODOVNIŠKA ANALIZA ZA JEZERSKO-SOLČAVSKO IN OPLEMENJENO JS PASMO	49
5.1.1 Informativnost mikrosatelitov za JS in JSR populacijo	49
5.1.1.1 Informativnost označevalcev za jezersko-solčavsko ovco	49
5.1.1.2 Informativne lastnosti označevalcev za oplemenjeno jezersko-solčavsko ovco	50
5.1.2 Preverjanje rodovniških podatkov	50
5.2 DOLOČANJE OČETOVSTVA ZA ISTRSKO PRAMENKO	53

5.3 KAJ NAM LAHKO PONUJAJO MOLEKULARNI OZNAČEVALCI NA PODROČJU OVČEREJE	54
6 POVZETEK	56
7 VIRI	57
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Priprava 100 ml pufra za lizo	23
Preglednica 2: Priprava 100ml TE pufra pH = 8,0	24
Preglednica 3: Seznam mikrosatelitnih označevalcev	25
Preglednica 4: PCR reakcijska mešanica	26
Preglednica 5: Priprava 1 litra 0,5 × TBE pufra	28
Preglednica 6: Priprava 1 litra 10 × TBE pufra	28
Preglednica 7: Mikrosatelitne označevalce, smo združili med sabo, glede na dolžino baznih parov	30
Preglednica 8: Število genotipiziranih živali po pasmah in rejcih	34
Preglednica 9: Primer genotipizirane ovčje družine istrske pramenke z osmimi mikrosatelitnimi označevalci. Preglednica prikazuje DNA profil matere, očeta in potomca. Številke pomenijo različne alelne oblike mikrosatelita na osmih lokusih v genomu. Potomec prejme od vsakega starša po en alel	36
Preglednica 10: Poiskus genotipizacije družine z osmimi lokusi ni bil uspešen, saj sta za očeta ostala dva kandidata (Kan. 1 in 2)	41
Preglednica 11: Genotipi na dodatnih lokusih	42

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Jezersko-solčavska pasma (Foto: Volčič T.)	3
Slika 2: Istrska pramenka (Foto: Volčič T.)	4
Slika 3: Oplemenjena jezersko-solčavska pasma (Foto: Volčič T.)	5
Slika 4: Prikaz prenosa alela iz staršev na potomca	9
Slika 5: Prikaz odvzema tkiva z rovašenjem pri ovnih istrske pramenke (Foto: Volčič T.)	21
Slika 6: Prikaz vzorca po centrifugiranju DNA lizata in PCl med DNA ekstrakcijo (Foto: Volčič T.)	22
Slika 7: Preizkus delovanja DNA	29
Slika 8: ELEKTROFEROGRAM. Primer genotipizirane družine Istrske pramenke za prvi set genetskih označevalcev McM42, TGLA53, MAF65, McM527	35
Slika 9: ELEKTROFEROGRAM. Primer genotipizirane družine Istrske pramenke za drugi set genetskih označevalcev OarCP49, OarFCB11, OarAE119, MAF214	36
Slika 10: Slikovni prikaz rodovnika ki ga za posamezno žival izriše program Atlas. Levo je prikazana JS družina rejca 6, desno pa JSR družina rejca 1. Vsaka žival je predstavljen z identifikacijsko številko npr. OČE rejca 6 ima ID 293542. Pri potomcu obarvana števila lokusov (števila baznih parov) prikazujejo alele, ki jih potomec podeduje po strani očeta (modra) in po strani matere (rdeče)	37
Slika 11: Primer neskladja genotipov starša z genotipom potomca pri rejcu 1	38
Slika 12: Primer neskladja genotipov starša z genotipom potomca pri rejcu 3	39
Slika 13: Neujemanje genotipa očeta z genotipom potomca pri rejcu 5	39
Slika 14: Neujemanje genotipov matere z genotipom potomca pri rejcu 2	40
Slika 15: Očetovstvo z osmimi mikrosatelitnimi označevalci smo določili trem potomcem IP	41
Slika 16: Uspešna določitev očeta z dvanajstimi mikrosatelitnimi označevalci	42
Slika 17: Število alelov pri pasmah ovc za posamezne mikrosatelitne lokuse	43

Slika 18: Frekvence alelov za posamezne mikrosatelitne lokuse; zvezdica označuje privatne alele	44
Slika 19: Povprečni deleži heterozigotnih lokusov pri JSR, JS in IP	45
Slika 20: Povprečna heterozigotnost mikrosatelitnih lokusov za vse tri pasme skupaj	46
Slika 21: Levo je prikazan rodovnik jagnjeta 294651, taki kot mu je bil pripisan po rojstvu (pri očetu in materi so z rdečo barvo označena števila katera se ne ujemajo z genotipom potomca). Desno pa je predstavljen rodovnik, tako kot smo ga določili z analizo mikrosatelitnih lokusov	50
Slika 22: Naraščanje verjetnosti uspešne izključitve napačnega očeta z dodajanjem mikrosatelitnih lokusov (prirejeno po Dovč, 1994)	53

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam družin po pasmah in rejcih vključeni v raziskavo

Priloga B: Pregled genotipiziranih mikrosatelitnih lokusov posameznih živali

Priloga C: Pogostost pojavljanja genotipov na lokusih za oplemenjeno jezersko-solčavsko pasmo

Priloga D: Pogostost pojavljanja genotipov na lokusih za jezersko-solčavsko pasmo

Priloga E: Pogostost pojavljanja genotipov na lokusih za istrsko pramenko

Priloga F: Grafikona prikazujeta deleže heterozigotnosti za posamezne označevalce za pasmi JS (levo) in JSR (desno). Rdeče smo obarvali tiste označevalce, kateri so se izkazali za zelo informativne, medtem ko črno obarvani mikrosateliti za pasmo ne predstavljajo visoke informativne vrednosti. Rumeno obarvan stolpec predstavlja povprečje heterozigotnosti vseh lokusov za pasmo.

Priloga G: Delež heterozigotnosti za posamezne označevalce za IP pasmo

1 UVOD

Preverjanje porekla z uporabo molekularnih označevalcev je relativno uveljavljena metoda pri nekaterih vrstah domačih živalih kot so konji, govedo in psi. Velik pomen pa ima tudi pri laboratorijskih in eksotičnih živalih. Pri teh vrstah živali se je ugotavljanje porekla z uporabo molekularnih označevalcev razvilo predvsem zaradi cenovne vrednosti plemenskih živali, ter zaradi omejitve pri trgovanju in prometu z le tistimi linijami živali, ki imajo predložen rodovniški certifikat. Potrebno je poudariti, da kljub skrbi za natančno vodenje rodovniških knjig, vedno prihaja do napak. Dodatna molekularno genetska analiza nam omogoči, da preverimo, če so napisani rodovniški podatki pravi, torej ali je neka žival dejansko potomec navedenih staršev.

Pri ovcah je imelo v preteklosti preverjanje porekla manjši pomen. Molekularno genetske študije so bile bolj v rabi za oceno genetske sorodnosti oziroma diverzitete populacij ovc. V sedanjem času pa, ko je vse več populacij v selekcijskih programih ter v programih obveznega genotipiziranja za prionski gen (PrP), bi bilo zaželeno imeti metode za dodatno preverjanje porekla. Na primer v velikih čredah ovc, kjer v čredi plodi več ovnov hkrati, je celo nemogoče določiti očeta, poleg tega pa se tudi v tropih s kontroliranimi pripusti zgodi, da je zabeležen napačen oče. Če je jagnje, ki ima dvomljiv rodovnik nato izbrano za test, je zaželeno, da z dodatno molekularno genetsko metodo ugotovimo poreklo vsaj po očetu. To je pomembno tako z vidika ocenjevanja plemenske vrednosti očeta, kakor z vidika kontrole inbridinga, torej izogibanju nadaljnega parjenja v sorodstvu ter z vidika zanesljivejše genotipizacije za PrP lokus. Raziskavo smo izvedli z namenom:

- da bi z uporabo molekularnih genetskih označevalcev preverili poreklo pri jezersko-solčavski (JS) in oplemenjeni JS pasmi ter primerjali rezultate z že znanimi rodovniškimi podatki,
- da bi določili očetovstvo v tropu istrskih pramenk, kjer je v času parjenja prisotnih več plemenskih ovnov,
- da bi ocenili informativno vrednost uporabljenih mikrosatelitnih označevalcev

2 PREGLED OBJAV

2.1 OPIS PASEM OVAC VKLJUČENIH V RAZISKAVO

V Sloveniji redimo štiri avtohtone pasme ovac. Istrska pramenka in bovška ovca sta glavni pasmi za prirejo mleka. K pasmam za prirejo mesa uvrščamo poleg jezersko-solčavske pasme tudi oplemenjeno jezersko-solčavsko pasmo, ki je po številu ovac najštevilčnejša pasma v Sloveniji in spada med tradicionalne pasme za prirejo mesa. Poleg njiju pa k mesnim pasmam za prirejo jagnjet uvrščamo še belokranjsko pramenko, ki je tudi naša avtohtona pasma (Kompan in sod., 1996). V raziskavo so bile vključene tri pasme, in sicer jezersko-solčavska, oplemenjena jezersko-solčavska pasma in istrska pramenka.

2.1.1 Jezersko solčavska pasma

Jezersko-solčavska ovca (v nadaljevanju JS), ki spada v skupino planinskih ovac vzhodnih Alp, je nastala na območju Kamniško-Savinjskih Alp in Karavank. Nastala je s križanjem domače primitivne bele ovce (Zaupelschaf) z bergamaško in padovansko ovco. Po bergamaški ovci je podedovala značilen izbočen profil glave in velik okvir, medtem ko je križanje s padovansko ovco izboljšalo kakovost volne. Po prvotni domači ovci je obdržala celoletno plodnost - poliestričnost (Kompan in sod., 1999).

Ovce JS pasme so precej velike, v vihru merijo od 65 do 67 cm, ovni pa več kot 70 cm. Telesna masa znaša od 65 do 75 kg pri ovcah, medtem ko ovni dosežejo maso čez 100 kg. Njene prepoznavne fenotipske značilnosti so poleg izbočene nosne linije še velika, viseča ušesa, dolg in z volno poraščen rep, čvrste in dolge noge ter močan in dolg hrbet. Mladice spolno dozori pri starosti 6 do 8 mesecev, medtem ko ovni pri starosti 7 do 10 mesecev. Gnezda so v povprečju velika od 1,4 do 1,5 jagnjeta na ovco, kar pomeni, da je plodnost te pasme dobra, saj se pri jagnjitvah pogosto pojavljajo tudi dvojčki (Kompan in sod., 1999). V registru pasem je bilo za leto 2005 ocenjeno, da je bil stalež vseh čistopasemskih živali JS v Sloveniji 17500. V rodovniški knjigi je za isto leto objavljeno, da je bilo število

čistopasemskih plemenic v kontroli 4538, čistopasemskih plemenjakov pa 295 (Kompan in sod., 2006).



Slika 1: Jezersko-solčavska pasma (Foto: Volčič T.)

2.1.2 Istrska pramenka

Pasmo, ki je dobila ime po polotoku Istra in izrazito grobi, dolgi ter pramenasti volni danes redimo predvsem na območju Krasa, Istre in ponekod tudi v Beli krajini. Istrska pramenka izvira iz evropskega muflona. Njen prednik je domača primitivna bela ovca, ki je bila razširjena po vsej Evropi in znana pod imenom Zackel (Zackelschaf) (Kompan in sod., 1999).

Telesna zgradba kaže, da je »istrijanka« prilagojena dolgi hoji in paši po suhem kraškem terenu, saj ima dolg trup velikega okvirja na močnih in čvrstih nogah. Telesna masa ovc znaša 65 do 80 kg, ovni pa redkeje presežejo 100 kg telesne mase. Fenotipska posebnost živali moškega spola je, da imajo dobro razvite zavite rogove, pri ovcah pa rogatost ni tako pogosta. Barva večine ovc je bela s temnimi lisami po glavi in trupu. Glava je močna s štrlečimi ušesi, izbočena nosna linija pa vodi v ošiljen sprednji del gobca. Tako kot drugi soji pramenk je tudi

istrska pramenka monoestrična ter pozno zrela ovca, saj je za pripuste primerna šele pri starosti 16 do 18 mesecev. V gnezdu ima običajno eno jagnje. V laktaciji da od 100 do 150 kg mleka z visokim odstotkom mlečne maščobe (9-13 %) in beljakovin (6-7 %) (Kompan in sod., 1999).

V registru pasem je istrska pramenka označena kot ogrožena avtohtona pasma. V letu 2005 je bilo ocenjeno, da se je število ovc istrske pramenke zmanjšalo za 100 živali v primerjavi s prejšnjim letom, in sicer stalež čistopasemskih IP je v letu 2005 znašal 1100 živali. V rodovniško knjigo je bilo leta 2005 vpisanih 703 čistopasemskih plemenic in 60 plemenjakov istrske pramenke (Kompan in sod., 2006).



Slika 2: Istrska pramenka (Foto: Volčič T.)

2.1.3 Oplemenjena jezersko-solčavska pasma (JSR)

Za oplemenjevanje domače Jezersko-solčavske pasme uporabljajo že od leta 1982 romanovsko pasmo. 50 % romanovske krvi je dalo tip ovce, ki je primerna za intenzivno mesno rejo (Kompan in sod., 1999).

V primerjavi z jezersko-solčavsko ovco so živali oplemenjene jezersko-solčavske pasme lažje (ovce 55 do 70 kg), imajo krajše noge in rep ter manjšo, z dlako poraščeno glavo. Trup je srednje širok, glava plemenita z rahlo izbočenim ali ravnim profilom, ušesa so srednje velika ter štrleča v stran. Pasma odlikujejo zgodnja spolna zrelost, poliestričnost in visoka plodnost z 1,8 jagnjeta na gnezdo (Kompan in sod., 1999).

Po podatkih iz registra pasem je bilo za leto 2005 ocenjeno, da znaša stalež čistopasemskih JSR ovc 80000 živali. V rodovniško knjigo je bilo istega leta vpisanih 7569 čistopasemskih plemenic in 326 plemenjakov JSR pasme (Kompan in sod., 2006).



Slika 3: Oplemenjena jezersko-solčavska pasma (foto: Volčič T.)

2.2 UPORABA GENETSKIH OZNAČEVALCEV ZA UGOTAVLJANJE POREKLA

Individualnost osebka lahko prikažemo na ravni DNA s pomočjo različnih molekularnih tehnik, ki nam omogočajo odkrivanje genetskih razlik med osebki. Preverjanje porekla, gensko kartiranje, forenzične preiskave in genska diagnostika so le nekatere izmed možnosti za uporabo tipiziranja DNA (Dovč, 1994).

Na področju živinoreje ima velik pomen nadzor rodovniških podatkov s pomočjo genotipizacije DNA. Ker je identiteta očeta velikokrat bolj vprašljiva kot identiteta matere, je večina postopkov bolj usmerjena v preverjanje očetovstva. V ta namen uporabljamo molekularno genetske metode na osnovi genetskih označevalcev (Dovč, 1994).

Genetski označevalec je lahko katerikoli predel v genomu, kjer obstajajo razlike v zaporedju nukleotidov v DNA. Na ravni populacije se ta variabilnost kaže v razlikah med osebki znotraj populacije. Vendar te razlike nimajo bistvenega vpliva na fenotip živali, kljub temu pa nam razkrivajo genetsko sorodnost med osebki. Če je pojav teh razlik zelo redek, jo imenujemo mutacija, če pa so te razlike pogoste jih imenujemo polimorfizmi. Skratka, genetski označevalci so zaporedja znotraj verige DNA, v katerih se osebki malenkostno razlikujejo, lahko pa so tudi geni za posamezne lastnosti, ki nam omogočajo, da sledimo njihovo dedovanje znotraj družin (Terčič in sod., 1996).

V splošnem so za potrebe ugotavljanje porekla pogosto v rabi naslednji označevalci:

- Označevalci tipa 1 predstavljajo kodogene regije genoma in izražajo zmerno polimorfno. Predstavnik teh označevalcev so RFLP označevalci (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ali polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov), ki se pogosto uporabljajo za študij genetskih distanc med bolj oddaljenimi taksoni in namene genetskega kartiranja ali ugotavljanja prisotnosti določene mutacije ipd (Dovč in sod., 2006).
- Označevalci tipa 2 se nahajajo predvsem v nekodogenih območjih genoma, ki jih zaznamujejo repetitivne regije in izražajo visoko stopnjo polimorfizma. Predstavniki teh označevalcev so VNTR označevalci (ang.: *Variable Number of Tandem Repeats* ali variabilno število zaporednih ponovitev), med katere uvrščamo mini in mikrosatelite. To metodo uporabljamo pri identifikaciji osebkov (rodovništvo in forenzika) pri

genskem mapiranju in v populacijskih študijah sorodnejših taksonov (Dovč in sod., 2006).

- Novejši SNP označevalci

Polimorfizmi enega baznega para ali SNP (*ang.: Single Nucleotide Polymorphism*) so definirani kot eno bazna mesta v genomski DNA, ki so gosto in enakomerno razporejena po genomu in omogočajo odkrivanje genetskih osnov za lastnosti, ki so se fiksirale v določeni populaciji kot posledica selekcije ali mutacij oz. bolezni (Perše in sod., 2007). Kadar se enobazne variacije pojavljajo v več kot 1 % populacije, govorimo o SNP-ju. SNP-ji se uporabljajo kot genetski markerji v številnih genomskih študijah za detekcijo genov ali neznanih genetskih variant, ki prispevajo k skupnim genetsko kompleksnim boleznim in motnjam (Erčulj, 2007).

Pomembne značilnosti, s katerimi ocenjujemo dobre genetske označevalce (Glenn, 1995, cit. po Terčič, 1996):

- Kazati morajo veliko stopnjo variabilnosti, kajti to zagotavlja večjo heterozigotnost. Osebek, ki je heterozigoten za določen označevalec pravimo, da je za ta lokus informativen.
- Po kromosomih morajo biti enakomerno razporejeni in za uporabo jih mora biti veliko število.
- Njihova identifikacija mora biti enostavna in cenena.

Mikrosatelitni označevalci izpolnjujejo vse te zahteve, in sicer so visoko variabilni, na razpolago jih je na tisoče, naključno so razpršeni po genomu in enostavno jih je analizirati, zato so najpogosteje uporabljen tip genetskih označevalcev (Glenn, 1995, cit. po Terčič, 1996).

2.2.1 Mikrosateliti

Mikrosateliti so nukleotidna zaporedja majhnih odsekov DNA, sestavljena iz zaporednih ponovitev. Na ravni dezoksiribonukleinske kisline (DNA), predstavljajo nukleotidi osnovne gradbene elemente, ki se v živalskih celicah nahajajo povečini v jedru, v manjšem delu pa so nukleotidi zastopani tudi v mitohondrijih. Poleg tega so nukleotidi vir genetskih informacij vsake celice, zapisani v dolgih nukleotidnih zaporedjih. Kljub veliki kompleksnosti živalskega genoma, ki ga sestavljata dve kopiji po 3,5 milijarde baznih parov nukleotidov, pokrivajo komaj 2 do 3 % genoma kodogene regije imenovane geni, v katerih so zapisane dedne lastnosti. Ostali del pa predstavljajo nekodogena zaporedja, ki niso pod strogim selekcijskim pritiskom in ločujejo posamezne gene, nahajajo pa se tudi znotraj posameznih genov. Značilnosti nekodogenih zaporedij je večja pogostost pojavljanja sprememb s ponavljajočimi se nukleotidnimi zaporedji imenovanimi sekvenčni motivi. Sekvenčni motivi so lahko različno dolgi in različno porazdeljeni po celotnem evkariontskem genomu (Kavar in Dovč, 1999).

V splošnem vsako ponovitev, ki je sestavljena iz največ šest nukleotidov dolgih sekvenčnih motivov, označujemo kot mikrosatelit. Najpogosteje se uporabljajo mikrosateliti z dinukleotidno ponovitvijo CA in TG in trinukleotidno ponovitvijo CAG in AAT. Znanstveniki ocenjujejo, da je v živalskih genomih nekaj sto tisoč mest (lokusov), na katerih se nahajajo mikrosateliti (Goldstein in Schlotterer, 1999).

Na osnovi mikrosatelitov preučujemo genetsko strukturo populacij, na primer križanja, parjenja v sorodstvu, spolno in socialno strukturo populacij (Razpet, 2004). Iz tega sledi, da so mikrosateliti pomembno orodje na številnih področjih genetskega raziskovanja, kot je gensko kartiranje, preverjanje porekla živali, ocenjevanja genetskih distanc med sorodnimi vrstami ali celo populacijami/pasmami znotraj vrste. Tukaj velja poudariti, da lahko te tehnike služijo tudi kot alternativni način pri ohranjanju genskih virov oz. vrst živali, katerim grozi izginotje (Kavar in Dovč, 1999).

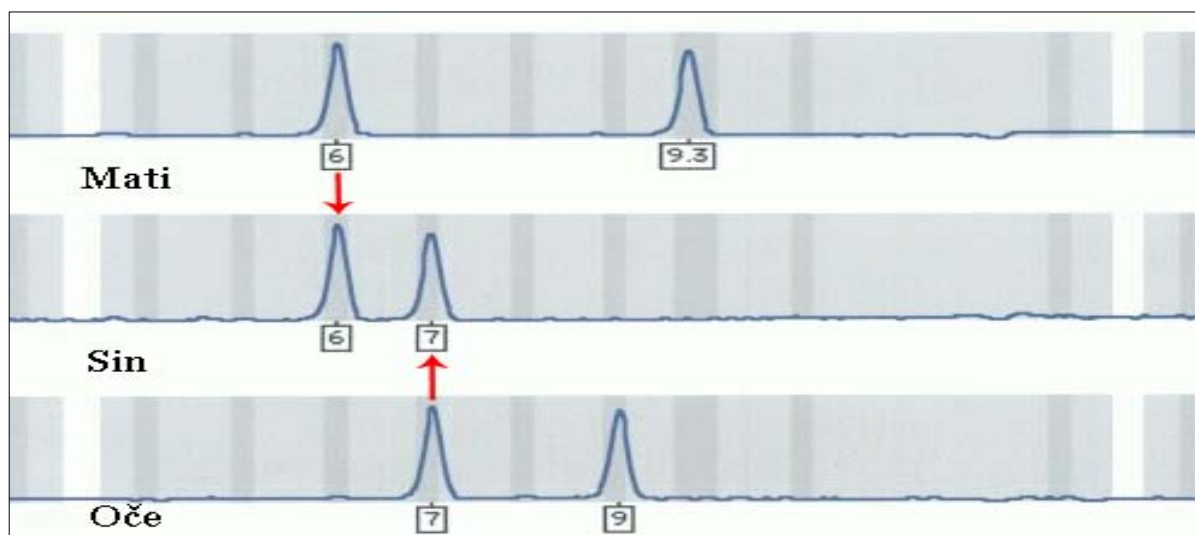
Spodaj je navedenih nekaj razlogov zakaj je uporaba mikrosatelitnih označevalcev tako razširjena (Razpet, 2004):

- enostavna izolacija DNA,
- uporabljamo veliko število lokusov,
- v eni PCR lahko pomnožimo več lokusov hkrati, tako prihranimo čas in znižamo ceno,
- material, katerega uporabljamo za raziskave ni pridobljen na invaziven način (dlaka, slina, iztrebki), torej brez žrtvovanja organizmov.

2.2.2 Preverjanje porekla živali

Veliko število mikrosatelitnih lokusov in visoka stopnja variabilnosti na številnih lokusih omogočata izbiro visoko informativnih mikrosatelitnih označevalcev, ki dopuščajo identifikacijo posameznih osebkov (Kavar in Dovč, 1999).

Z uporabo sodobne tehnologije za analizo mikrosatelitskih lokusov lahko postopke standardiziramo in avtomatiziramo ter tako hitro in enostavno pridemo do rezultatov. Pri odčitavanju genotipa (števila baznih parov) posameznega označevalca upoštevamo, da potomec podeduje dva alela, enega po očetovi strani, drugega pa po strani matere (Slika 4). (Kavar in Dovč., 1999).



Slika 4: Prikaz prenosa alela iz staršev na potomca (GENDIA, 2007)

Če posameznemu osebkku združimo genotipe na več lokusih dobimo sestavljen genotip, ki predstavlja molekularni opis osebkka na izbranih lokusih. S primerjanjem sestavljenih genotipov osebkov, ki so domnevno sorodstveno povezani, lahko sorodstvene zveze potrdimo ali ovržemo. Z uporabo večjega števila mikrosatelitnih lokusov (10 do 15) se zelo zmanjša verjetnost, da bi imela dva osebkka po naključju enak sestavljen genotip. 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).

Informativnost oz. polimorfnost označevalecja v populaciji lahko predstavimo z vrednostjo PIC (*P*olymorphism *I*nformation *C*ontent), ki je odvisna od števila alelov na lokusu in porazdelitve alelov v populaciji. Za oceno informativnosti je v praksi najpogosteje uporabljena vrednost PIC.

2.2.3 Mikrosatelitni lokusi pri ovcah in kozah

Pri ovcah je doslej znanih že čez 680 mikrosatelitnih lokusov in 423 mikrosatelitnih lokusov pri kozah. Podatki o njih so zbrani in dobro predstavljeni na spletnih straneh

- Univerze v Kaliforniji (ZDA) (ovce):

<http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>

- Inštituta INRA jouy-en-Josas (F) (koze):

<http://dga.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/summary.operl?BASE=goat>

Tam so poleg osnovnih informacij o lokusih (zaporedja začetnih oligonukleotidov, pogoji za PCR, viri) zbrani še podatki o polimorfnosti lokusov pri posameznih pasmah, predstavljen pa je tudi trenutni status genske karte ovce oziroma koze.

2.2.4 Uporaba DNA označevalcev za določitev očetovstva v čredah z več plemenskimi ovni

V čredah drobnice, kjer je pri parjenju prisoten en plemenski oven običajno ne prihaja do rodovniških neskladij, saj rejci sami poskrbijo za natančno vodenje porekla. Drugače je v rejah, kjer se v času pripustov velikih čred uporablja več plemenskih ovnov hkrati. V teh primerih lahko predstavlja rodovništvo in kontrola porekla problem. Take črede običajno z leti dosežejo visoko stopnjo inbridiranosti, čigar posledice se kažejo v manjši rodnosti, raznih boleznih in večji pogostosti recesivnih mutacij (Laughlin in sod., 2003).

Laughlin in sod. (2003) so v ta namen, z uporabo mikrosatelitnih označevalcev, ugotavljali očetovstvo na potomcih iz čred, kjer je pri pripustih prisotnih več samcev hkrati. V raziskavo so vključili pasmo Rambouillet, in sicer 79 jagnjet, 68 ovc (mater jagnjet) in 4 ovne, ki so v tej populaciji takrat plodili. Na ovnih so v predhodnem pregledu vključili 73 mikrosatelitnih označevalcev, od katerih so izbrali tri označevalce z visoko stopnjo informativnosti pri tej pasmi, in sicer označevalce:

- HUI614, z 11 aleli,
- OarHH35, z 4 aleli,
- OarFCB304, z 7 aleli.

Cilj te raziskave je bil:

1. Oceniti tehnično izvršljivost uporabe DNA označevalcev v čredi pasme Rambouillet.
2. Določiti odstotek jagnjet, ki jih lahko pripišemo očetu ne da bi poznali genotip matere tega jagnjeta (Laughlin in sod., 2003).

Ugotovitve raziskave kažejo, da so lahko ob primerjavi genotipov na treh mikrosatelitnih označevalcih 73. jagnjetom od 79. jagnjet (92 %) določili očeta z izločitvijo ostalih treh, če so

poznali tudi genotip matere. Šestim potomcem, katerim ni bilo moč dodeliti očeta, so pozneje določili le-tega z uporabo enega do treh dodatnih označevalcev. Število označevalcev potrebnih za dodelitev očetovstva je odvisno od polimorfnosti med očeti za izbrane mikrosatelitne označevalce (Laughlin in sod., 2003).

Kadar so bili genotipi označevalcev ocenjeni brez informacije genotipa matere so lahko 58. jagnjetom od 79. jagnjet (73 %) določili očeta. V tem primeu (brez informacije genotipa matere, s katerim bi ločili očetovske in materine alele na lokusu potomca) se je pri 27 % potomcev pojavil problem, ker ni bilo mogoče izločiti treh očetov, temveč sta ostala še vedno dva ali več kandidatov. V takih primerih Laughlin in sod. (2003) predlagajo uporabo dodatnih označevalcev.

Napačna mati je bila dokazana 10 % jagnjetom (8. od 79.). Laughlin in sod. (2003) smatrajo, da so vzrok jagnjitve na pašniku, kjer lahko pride do zamenjave med materjo in novorojencem. V teh primerih jagnje zredi ovca, ki v resnici ni njegova prava mati. Zaradi velikega števila mater, zahteva ugotavljanje pravilne matere z DNA genotipizacijo še dodatno število označevalcev v primerjavi z omejenim številom možnih očetov, kar pa poveča ceno analize. Ta problem lahko rejci rešijo sami, tako da ovce jagnjijo v posameznih boksih, kjer se porodi evidentirajo in zabeležijo.

Rezultati iste študije so pokazali, da so v tem primeru trije polimorfni označevalci (HUI614, OarFCB304, OarHH35) zadostovali za določitev očeta v večini primerov (92%), če je bila v genotipizacijo vključena mati. Tako lahko zaključimo, da je uporaba mikrosatelitov za določanje sorodstva tehnično izvršljiva. Uporaba DNA označevalcev za ugotavljanje porekla omogoči rejcem, da v črede pripuščajo več ovnov naenkrat ter hkrati dosežejo skoraj stoodstotno pravilno vodenje rodovnika (Laughlin in sod., 2003).

2.2.5 Multipleksiranje mikrosatelitov

Najnovejše raziskave pri genetskem kontroliranju porekla drobnice so usmerjene v pomnoževanje večjega števila mikrosatelitnih lokusov hkrati v eni PCR reakciji. Ta način nam omogoči enostavno in hitro izvedbo analize, hkrati pa cenovno dostopnejšo izvedbo genotipizacije, kar bi lahko bilo dostopno tudi rejcem drobnice.

Poizkusi na to temo so se pri malih prežvekovalcih razvili nekoliko kasneje, saj so prednostno vlogo dobile cenovno bolj pomembne vrste plemenskih živali, kot so konji, govedo in druge. Do sedaj so bile pri ovcah izvedene kontrole porekla z mnogokratnimi mikrosateliti v laboratoriju Gruppi Sanguigni (LGS, Cremona, Italija), kjer so razvili dvodelni sistem, pri katerem so v eno PCR reakcijo v prvem setu združili 7, v drugem pa 8 mikrosatelitov. Prav tako so podoben sistem za ugotavljanje porekla razvili pri kozah, in sicer tu so uporabili dva seta, v enem po 6 in v drugem po 8 združenih mikrosatelitov. Ta dva sistema uporabljajo pri primerjalnem testu ISAG, čigar rezultati so predstavljeni na spletni strani: (<http://www.isag.org.uk/journal/comparisonguide.asp>) (Glowatzki-Mulis in sod., 2007).

Glowatzki-Mulis in sod. (2007) so v eni PCR reakciji preizkusili 19 združenih mikrosatelitov za ovce in 17 mikrosatelitov za koze. PCR multiplekse so preverili tako, da so v test vključili skupino 316 ovc desetih različnih pasem ter 426 koz enajstih različnih pasem. Namen raziskave je bil vsem živalim v poskusu dodeliti oz. jih neposredno razvrstiti v pasme iz katerih izvirajo.

Vzorci so preizkusili na ABI Prism 3100 Genetic Analyzerju (POP-4, pri temperaturi 45 °C). Analizo genotipov so izvedli z uporabo programske opreme za analizo podatkov GENESCAN Analysis, verzija 3.7, in GENOTYPER Software, verzija 3.7 (Glowatzki-Mulis in sod., 2007).

Glowatzki-Mulis in sod. (2007) so raziskavo označili kot uspešno, saj so skoraj vse posameznike dodelili pravi pasmi, le v nekaj primerih se je zgodilo, da je bil posameznik dodeljen k več različnim pasmam. Poleg tega menijo, da je lahko zmanjšana natančnost pri določanju pasme posledica omejenega števila mikrosatelitov, nepravilne identifikacije pasme

ali rejčevih napak pri registraciji. Poleg tega so opravili še statistično analizo in izračunali koeficijente, s katerimi so predstavili moč posameznega označevalca za diferenciacijo preučevanih populacij. Ocenjena verjetnost (PI), da sta genotipa dveh naključno izbranih posameznikov iz populacije identična, je nihala med $5,23 \times 10^{(-7)}$ in $2,24 \times 10^{(-18)}$ pri ovcah in med $5,11 \times 10^{(-4)}$ in $4,17 \times 10^{(-15)}$ pri kozah.

2.2.6 Primerjava različnih tkiv za mikrosatelitno analizo DNA

Achmann in sod. (1998) so v Avstriji predstavili primerjavo učinkovitosti delovanja DNA vzorcev, izoliranih iz krvi, sline, dlake in kožnega tkiva. Hkrati pa so preverjali poreklo z večkratnimi mikrosateliti v PCR reakciji z naslednjimi označevalci:

- V prvi večkratni PCR reakciji so združili 6 mikrosatelitnih lokusov: McM42, TGLA53, OarFCB20, INRA49, MAF65 in McM527. S tem setom mikrosatelitov je bila analizirana populacija avstrijske gorske ovce, ki je vključevala 301 ovc.
- V drugi večkratni PCR reakciji so združili 5 mikrosatelitnih lokusov: OarCP49, HSC, MAF214 in OarFCB11, ki so bili preizkušeni na 31. živalih.

Statistična analiza pri kontroli porekla je pokazala, da se je število pomnoženih alelov na enem lokusu gibalo med 6 in 11. Povprečna heterozigotnost je znašala 0.73. Verjetnost izključitve nepravilno določenega roditelja je bila izračunana na 97,8 % za prvi set multipleks PCR 1 in 98,9 % za drugi set multipleks PCR 2. Kombinirana verjetnost izključitve pri obeh sistemih je bila 99,98 % (Achmann in sod., 1998).

Rezultati primerjave kažejo, da sta kri in kožno tkivo praviloma nudila visoko kvalitetne rezultate pri pomnoževanju DNA vzorcev, medtem ko vzorci DNA iz sline včasih niso uspeli pomnožiti vseh lokusov, najverjetneje zaradi nizke koncentracije DNA. DNA, izolirana iz dlake, se je bolje obnesla kot DNA izolirana iz sline, toda izkazala se je za manj učinkovito kot vzorec DNA izoliran iz krvi in kožnega tkiva, zlasti kadar so DNA iz dlake izolirali s

chelexom. Učinkovitost izolacije DNA iz dlak je najverjetneje odvisna od količine dlak, ki vsebujejo celice lasnih korenin. Prednost dajejo dlakam, hranjenim na sobni temperaturi, brez nadaljnjega konzerviranja, saj se tako rejcu prihrani delo in so primerne za analizo v večini primerov (95%) (Achmann in sod., 1998).

2.3 GENETSKE RAZISKAVE NA PODROČJU OVČEREJE V SLOVENIJI

Leta 2004 je stekel postopek kontrole porekla z molekularnimi metodami za trop istrskih pramenk iz Centra za sonaravno rekultiviranje Vremščica . Analizo izvajajo na Veterinarski fakulteti v Ljubljani, kjer uporabljajo standardni set mikrosatelitnih lokusov (enake označevalce kot smo jih uporabljali v naši raziskavi), ki omogoča izločitev napačnih prednikov z več kot 99 % verjetnostjo (Cotman, 2007).

V genetskem laboratoriju Oddelka za zootehniko so prve poskuse genotipizacije z mikrosatelitnimi lokusi uvedli leta 1994. Prvotni namen je bil opis genetske variabilnosti med avtohtonimi populacijami ovc. Nakup sodobnih aparatov z avtomatsko analizo genotipov pa je omogočil še identifikacijo osebkov in preverjanje porekla (Kavar in Dovč, 1999). Tako so Kavar in sod. (2002) prvotne ugotovitve genetske variabilnosti med avtohtonimi pasmami ovc še dodatno obogatili s statističnimi modeli.

Zaradi pojava bolezni praskavca se je večina ovčerejskih držav odzvala na le-to ter začela izvajati nacionalne programe zatiranja praskavca. Tako tudi Slovenija v skladu z evropsko direktivo opravlja predhodne analize za določitev frekvenc posameznih alelov z reakcijo določanja nukleotidnega zaporedja fragmentov na genu PrP. Z genotipizacijo lahko za bolezen dovzetne ovce odkrijemo že pred pojavom bolezni in jih izločimo (Barut, 2005).

2.3.1 Genetske razlike med istrsko pramenko, bovško ovco in jezersko-solčavsko ovco

Z namenom, da bi ocenili genetsko sorodnost med tremi slovenskimi avtohtonimi pasmami ovc, so Kavar in sod. (2002) preučevali razlike na mikrosatelitnih lokusih: MAF214,

OarCP49, TGLA53, MAF65, OarAE119, OarFCB11, McM42 in McM527. V ta namen so genotipizirali 95 istrskih pramenk, 272 bovških ovc in 42 jezersko solčavskih ovc (Kavar in sod., 2002).

Rezultate analize so Kavar in sod., (2002) primerjali z zgodovinskimi podatki o takratni ovci. Stari zapisi pričajo o obstoju jezerskih in pokrajinskih ovc, pri čemer naj bi bile pokrajinske ovce majhne, po barvi črne, bele ali pisane (cikaste), rejene na Goriškem in v Istri. Opis ustreza današnjim istrskim pramenkam. O nastanku jezerske ovce piše, da naj bi Korošci domače ovce plemenili z bergamaškimi ali padovanskimi ovni. Dular omenja tudi trbiške ovce, ki naj bi bile precej podobne jezerskim, saj med pasmama ni nikoli našel posebnih razlik (Dular, 1895, cit. po Kavar in sod., 2002). Da bi bile trbiške ovce lahko prednice današnjih bovških ovc, kaže poleg imena (Trbiž pri Bovcu) tudi Bleiweisov (1871, cit. po Kavar in sod., 2002) zapis o trbiški ovci, v katerem pravi, da so ovce s kratkimi ušesi bolj mlečne. Visoka mlečnost in kratki uhlji pa sta prav značilnost današnjih bovških ovc (Kompan in sod., 1996).

Z namenom, da bi nekoliko razjasnili informacije o nastanku in morebitni sorodstveni povezavi med bovško in jezersko ovco, so Kavar in sod. (2002) proučili razlike, tako na ravni osebkov, kot tudi na ravni pasem. Za proučevanje razlik na ravni osebkov so izvedli korespondenčno analizo in preverili če se genotipi osebkov uvrščajo v ustrezno pasmo. Za proučevanje razlik na ravni pasem pa so izračunali frekvence alelov, genetske razdalje med posameznimi pasmami in delež variance, ki izhaja iz razlik med pasmami (F_{ST}).

Rezultati vseh izvedenih analiz kažejo, da razlike med pasmami niso zelo velike ter da sta si bovška in jezersko solčavska ovca genetsko bližji kot istrska pramenka.

- Frekvence alelov - 12 alelov je pogostih ($> 10\%$). Najdeni so bili v vseh treh pasmah, na vsakem od proučevanih lokusov so našli tudi enega do pet za pasmo značilnih, privatnih alelov. Osem alelov je bilo specifičnih za istrsko pramenko in bovško ovco, trije pa za jezersko-solčavsko ovco. Kavar in sod. (2002) glede pogostosti privatnih alelov menijo, da so ti precej redki.

- Korespondenčna analiza - delno prekrivanje osebkov bovške in jezersko-solčavske ovce, zaradi zelo podobnih genotipov v obeh pasmah, so verjetno posledica kombinacije visoke pogostosti splošno razširjenih alelov in nizke pogostosti za pasmo specifičnih alelov. To potrjujejo manjše razlike v sorodnosti med jezersko in bovško pasmo, kot med istrsko pramenko in bovško ovco oz. istrsko pramenko in jezersko-solčavsko ovco. Visoka pogostost alelov značilnih samo za istrsko pramenko uvrsti to pasmo v svojo skupino (Kavar in sod., 2002).
- Uvrščanje genotipov osebkov v pasme - genotipi istrske pramenke so se v večini primerov uvrstili v ustrezno pasemsko skupino, medtem ko pri ločevanju ostalih dveh pasem v več primerih niso mogli ločiti vzorca bovške in jezersko-solčavske pasme (Kavar in sod., 2002).
- F_{ST} vrednosti med pari pasem - s to metodo so Kavar in sod. (2002) ocenjevali genetske razdalje v primerih, ko nas zanimajo razlike, ki so nastale v krajšem časovnem obdobju. Ocene potrjujejo višjo sorodnost med bovško in jezersko ovco ($F_{ST} = 0,044$), kot med istrsko pramenko in bovško ovco ($F_{ST} = 0,064$) ali med istrsko pramenko in jezersko ovco ($F_{ST} = 0,075$). F_{ST} vrednost, ki je bila izračunana za slovenske avtohtone pasme, je za 6 % nižja v primerjavi s F_{ST} vrednostjo, ki so jo ugotovili z analizo španskih pasem ovc (churra, latxa, castellana, aragonesa in merino) in je znašala 7 % oz. 9 %, če so vključili še awassi ovco (Arranz in sod., 2001; cit. po Kavar in sod., 2002).
- Delež variance, analiza AMOVA - rezultati analize AMOVA so pokazali, da večina variance izhaja iz razlik znotraj pasem, le približno 6 % se je da razložiti z razlikami med pasmami (Kavar in sod., 2002).

Rezultati, ki so jih Kavar in sod. (2002) dobili kažejo precejšen delež alelov, ki so skupni vsem trem pasmam, zato tudi razlike med njimi niso zelo velike. Iz tega predpostavljajo na skupen nastanek vseh treh pasem oz. še posebej bovške in jezersko-solčavske ovce. Dobljeni

rezultati potrjujejo hipotezo, ki je bila do sedaj navedena le v literaturi, in sicer da sta bovška in jezerska ovca nastali iz domače primitivne bele ovce. Tudi s strani podobnosti genotipov, ki so danes značilni za bovško in jezersko-solčavsko ovco, bi potrdilo stare zapise o minimalnih razlikah med jezersko in trbiško ovco. To bi seveda držalo ob predpostavki, da je trbiška ovca prednik bovške. Vendar tej trditvi nasprotuje dejstvo, da so rejci na Bovškem zavračali križanje z drugimi pasmami, ker so se bali, da bi se zmanjšala mlečnost ovc. Kavar in sod. (2002) menijo, da bodo šele nadaljnje raziskave dale jasno sliko in osvetlile vplive padovanske in bergamaške ovce, ki sta sodelovali pri nastanku jezersko solčavske pasme, pa tudi vplive drugih sojev pramenk na istrsko pramenko.

2.4 STRATEGIJA KONTROLE POREKLA DROBNICE V SLOVENIJI

Poreklo registriranih ovc je opisano z njihovim rodovnikom. Pravilnost rodovniških podatkov in zaupanje vanje je bistvenega pomena za rejce ovc, saj iz informacij o prednikih lahko sklepajo o tem, kaj lahko pričakujejo od živali. Da bi lažje razumeli rezultate genetskega določanja očetovstva in kaj nam ta tehnika v prihodnje ponuja, moramo v nadaljevanju predstaviti potek selekcijskega dela in določanje rodovništva na področju današnje ovčereje. Naloge kontrolorjev in naloge rejcev, ki sodelujejo v kontroli porekla in proizvodnje za drobnico v letu 2007 so predstavljene v nadaljevanju.

V čredah, kjer se redi več kot 80 živali, se pojavlja problem nadzora pripustov, ker se v tropih pripušča več ovnov hkrati. Zaradi tega je bistvenega pomena, da ima rejec v takih tropih natančen nadzor nad pripusti svojih živali, tako v hlevu kot na paši. Zapisati si mora rodovniško številko licenciranega plemenjaka, ki je plodil in rodovniške številke ovc, ki so bile pripuščene z določenim plemenjakom (Navodila kontrolorjem ..., 2007).

Rejec, ki sodeluje v kontroli, mora natančno zapisovati podatke o poreklu in proizvodnji svojih živali. Podatke redno zapisuje ter jih hrani v hlevski knjigi, nakar jih posreduje kontrolorju (Navodila in naloge rejcev ..., 2006).

2.4.1 Zapisovanje porodov in označevanje mladičev

Rejcu pomaga označevati mladiče kontrolor, dokler ni rejec za označevanje usposobljen sam. Vsi mladiči morajo biti označeni takoj po rojstvu. Mladiče se označuje v skladu s predpisi za označevanje plemenske drobnice (Pravilnik o identifikaciji in registraciji drobnice). Podatke o jagnjitvah kontrolor zapiše na obrazec »Podatki o jagnjitvah«. Zapisati mora številko mladiča, rodovniško številko matere, rodovniško številko očeta, zaporedno jagnjitev, datum rojstva, spol, pasmo, številko rojenih in živorojenih mladičev, potek poroda, barvo, rojstno mesto in usodo mladiča. Zapisujejo se tudi abortusi in posebnosti oz. dedne napake (Navodila in naloge rejcev ..., 2006).

2.4.2 Odbira in priznavanje plemenjakov

Oven, ki v tropu plodi, mora biti po rejskem programu obvezno ocenjen, odbran in priznan. Ocenjevanje plemenjaka opravi ocenjevalec, v kolikor oven ni kupljen na eni izmed testnih postaj. Posebna komisija na osnovi dnevnega prirasta, velikosti gnezda, napovedi plemenske vrednosti, ocene zunanosti in pregleda semena odbranega plemenjaka razvrsti v enega od šestih kakovostnih razredov. V tropih, ki so vključeni v kontrolo porekla in proizvodnje, lahko plodijo samo plemenjaki, ki imajo eno izmed ocen: 1A, 1B in 2A. V primeru, da rejec oddaja moška jagnjeta na testno postajo, mora plemenjak, ki plodi v njegovem tropu, izhajati iz testne postaje (Navodila in naloge rejcev ..., 2006).

2.4.3 Izdaja »Izkaza o poreklu« (Rodovnika)

Ob prodaji plemenske drobnice prodajalec zaprosi selekcijsko službo za izdajo »Izkaza o poreklu«. Pri tem selekcijski službi predloži obrazec »prodaja in izločitve živali«, na katerem so zapisane rodovniške številke živali, za katere se izda potrdilo na naslov kupca, ki želi za živali izkaz o poreklu. Selekcijska služba lahko izda »Izkaz o poreklu« samo za živali, ki so

vodene v bazi in izvirajo od rejcev, ki so vključeni v kontrolo porekla in proizvodnje (Navodila kontrolorjem ..., 2007).

2.4.4 Sistem notranje kontrole

Podatke, ki jih rejci preko kontrolorjev posredujejo v skupno bazo podatkov, avtomatsko preverijo in prevedejo v pravilno zaporedje. V kolikor pride do napake, jih delavci za vnos in kontrolorji odpravijo, če pa to ni mogoče, se opravi nadkontrola na gospodarstvu, kjer se redi drobnica. Pri pojavu nesodelovanja ali nekorektnega vodenja evidenc s strani rejca v sistemu kontrole se naredi predlog za izključitev takega rejca iz sistema (Program strokovnih nalog ..., 2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORČENJE

V okviru raziskovalne naloge je bilo vključenih 47 ovčjih družin, in sicer 24 družin oplemenjene jezersko-solčavke pasme (JSR), 19 družin jezersko-solčavske pasme (JS) in 4 družine istrske pramenke (IP). Enoto družine predstavljajo oče, mati in njuni potomci. Vsi potomci katerim smo odvzeli vzorce krvi, so bili vključeni v kontrolo porekla in proizvodnje za drobnico.

Jemanje vzorcev smo izvedli na dva načina, in sicer jagnjetom z odvzemom krvi, plemenskim ovcam in ovnom pa z odvzemom ušesnega tkiva.

Odbranim jagnjetom (samcem), starim od 90 do 120 dni, je veterinar odvzel kri na karantenski postaji Horjul. Kri je bila pridobljena iz odvodne vratne vene (*v. jugularis*). Na enak način smo kri odvzeli tudi ovnom starim približno 250 do 300 dni na testni postaji v Logatcu. Pridobljeni vzorci so nam predstavljali populacijo **potomcev**.

Na Katedri za govedorejo, rejo drobnice, perutninarstvo, akvakulturo in sonaravno kmetijstvo smo preko internetne povezave dobili dostop do baze podatkov o drobnici in tako identificirali potomce ter pridobili lokacije reje njihovih staršev (plemenski ovni in ovce). Tem smo vzorce odvzeli z rovašenjem, to je odvzemom ušesnega tkiva. Postopek smo izvedli tako, da smo plemenskemu ovnu ali ovci, z razkuženimi kleščami (Hauptner 03 Herberholz), odščipnili košček uhlja velik približno 5 mm². Posamezni vzorec smo shranili v 1500 µl reagenčno posodico (Eppendorf), ki smo jih zamrznili pri temperaturi – 20 °C. Pridobljeni vzorci so nam predstavljali populacijo **staršev**.

Pri plemenskih ovcah pasme istrska pramenka smo vzorce ušesnega tkiva odvzeli na Centru za sonaravno rekultiviranje Vremščica. Poleg štirih vzorcev tkiva plemenskih ovac, smo odvzeli

vzorke vsem dvajsetim ovnom, ki so prisotni pri pripustih, haremski pripust.



Slika 5: Prikaz odvzema tkiva z rovašenjem pri ovnih istrske pramenke (foto: Volčič T.)

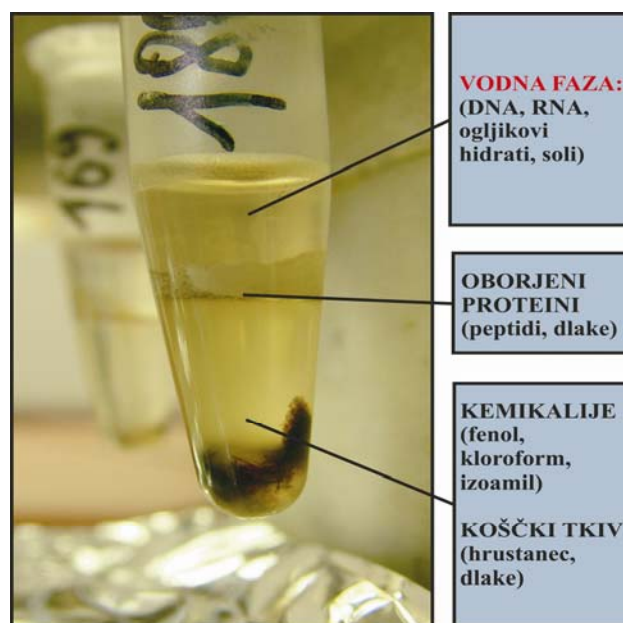
3.2 POSTOPKI V LABORATORIJU

3.2.1 Izolacija DNA iz ušesnega tkiva

Zamrznjeni košček ušesnega tkiva smo najprej odmrznili, nakar smo s škarjami odstranili dlake. Očiščeni vzorec smo dali v označeno 1500 μ l reagenčno posodico in dodali 300 μ l puфра za lizo ter (glej sekcijo 3.2.2) 5 μ l Proteinaze K. Tako pripravljen vzorec smo v vodni kopeli čez noč inkubirali na 55 °C ali ga dali v termoblok (Eppendorf, Nemčija) za najmanj 2 uri, kjer ga je naprava konstantno mešala. Encim proteinaza K je pri optimalni temperaturi ušesno tkivo razgradil oziroma hidroliziral (cepil) proteine, DNA pa je pri tem ostala nepoškodovana.

Po končani inkubaciji smo v digestoriju (Oprema kočevje, Slovenija) dodali 300 μ l PCI (fenol : kloroform : izoamil alkohol v razmerju 25 : 24 : 1). Tako pripravljeno raztopino smo sprva mešali ročno, in sicer 2 minuti, nato centrifugirali še 5 minut (Centrifuge 5417C Eppendorf, Nemčija) pri 20000g. Po končanem centrifugiranju so se v reagenčni posodici formirale 3 plasti (slika 2). Spodnja plast je poleg PCI vsebovala še koščke tkiv, dlak ki jih proteinaza K ni razgradila (hrustanec, kosti). Srednjo, tanko plast so sestavljali oborjeni proteini z ostanki dlak. Zgornjo plast ali vodna faza pa je vsebovala DNA, zaradi česar smo jo odpipetirali v nove reagenčne posodice in ji v digestoriju dodali 300 μ l CI (kloroform : izoamil alkohol v

razmerju 24 : 1). Raztopino smo centrifugirali 5 minut pri 20000g. Tokrat sta v reagenčni posodici nastali dve fazi, spodnja, ki je vsebovala CI in ostanke fenola ter zgornja vodna faza, ki smo jo ponovno odpipetirali in prestavili v nove reagenčne posodice ter dodali $2,5 \times$ volumen ledeno hladnega ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) 96 % etanola. Ob rahlem ročnem mešanju je etanol povzročil obarjenje oziroma precipitacijo DNA. V etanolu oborjena DNA se je po dvominutnem centrifugiranju pri 20000g prilepila na dno reagenčne posodice. Supernatant smo previdno odlili in oborino sprali s $500\mu\text{l}$ 75 % etanola ter ponovno centrifugirali 2 minuti pri 20000g. Odlili smo supernatant in DNA oborino sušili pri sobni temperaturi. Sušenje smo lahko skrajšali tako, da smo dobljeni pelet še enkrat na hitro centrifugirali in etanol odpipetirali, tako da nam je ostala samo še DNAoborina. V zadnjem koraku smo pelet raztopili v $100\mu\text{l}$ $1 \times$ TE pufra, ki vsebuje Tris $\text{pH} = 8,0$ (pri tem pH -ju je DNA maksimalno topna in obstojna), ter EDTA ki prepreči morebitno delovanje DNaz. Raztopino smo ročno premešali in jo hranili v hladilniku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, kot **založno raztopino** visoke koncentracije.



Slika 6: Prikaz vzorca po centrifugiranju DNA lizata in PCI med DNA ekstrakcijo (foto: Volčič T.)

3.2.2 Izolacija DNA iz krvi

Iz odmrznjenega vzorca krvi smo v reagenčne posodice odpipetirali 200 μ l krvi in dodali 800 μ l TE pufra. Raztopino smo centrifugirali 30 sekund na 12000g in nato supernatant odlili. Dobljenemu rdečemu sedimentu smo ponovno dodali 800 μ l TE pufra in korak ponovili trikrat oziroma tolikokrat dokler sediment ni postal bele barve. Dobljeni celični sediment smo z odrezanim pipetnim nastavkom resuspendirali z 200 μ l liznega pufra in 4 μ l protenaze K. Sledila je dvourni inkubacija s stalnim mešanjem v termobloku pri 56 °C ali pa smo čez noč pustili v vodni kopeli na 42 °C.

Naslednji koraki so bili isti kot pri izolaciji ušesnega tkiva. V digestoriju smo z enakimi volumni raztopino spirali z PCI (fenol : kloroform : izoamil alkohol) centrifugirali 10 minut pri 14000g, nato s CI (kloroform izoamil alkoholom) in centrifugirali 5 minut pri 10000g. Zgornjo fazo smo odpipetirali v nove reagenčne posodice in dodali 2,5 volumna na – 20 °C ohlajenega 96 % etanola. Reagenčno posodico smo nekajkrat ročno obračali, pri tem pa se je vsebina raztopine oborila, nakar smo vse skupaj dali za 30 minut v zmrzovalnik na – 20 °C. Sledil je postopek desetminutnega centrifugiranja raztopine pri 10000g, kar je povzročilo prilepljanje DNA na dno reagenčne posodice. Supernatant smo previdno odlili in dodali 500 μ l 70 % etanola. Raztopino smo ponovno centrifugirali 10 minut na 10000g in supernatant odlili ter ostali pelet pri sobni temperaturi posušili do voskaste konsistence. Nato smo ga raztopili v 100 μ l TE pufra in raztopino hranili v hladilniku pri 4 °C. Dobljena raztopina DNA nam je služila kot **založna raztopina** visoke koncentracije.

TE pufer in pufer za lizo smo pripravili po postopku navedenem v preglednici 1.

Preglednica 1: Priprava 100 ml pufra za lizo

1M TRIS pH = 8,3	2,0 ml
2M MgCl ₂	0,075 ml
KCl	2,50 ml
Tween 20	0.5 ml
Destilirana voda	Do skupnega volumna 100ml

Preglednica 2: Priprava 100ml TE pufra pH = 8,0

1M TRIS pH = 8,0	1 ml
0,5M EDTA pH = 8,0	0,2 ml
Destilirana voda	Do skupnega volumna 100ml

3.2.3 Določanje koncentracije DNA in priprava delovnih raztopin

Eden od načinov kvantitativnega določanja nukleinskih kislin je UV spektrofotometrija. Ta metoda določanja koncentracije DNA, temelji na dejstvu, da baze v DNA absorbirajo ultravijolično (UV) svetlobo z maksimalno absorbanco pri valovni dolžini 260 nm. Čistost vzorca preverimo z merjenjem absorbance pri dolžini 280 nm. Če smo imeli vzorce primerno čiste, smo iz razmerja absorbanč A_{260} / A_{280} dobili optimalno vrednost količnika med 1.7 do 1.8.

Vzorcem smo določili koncentracijo po naslednjem postopku. Iz založnega vzorca DNA smo odpipetirali 5 μ l raztopine in ga redčili z 495 μ l TE pufra (100-kratna redčitev vzorca). Po umeritvi fotospektrometra znamke Tecan Genios (Zurich, Švica) s slepim vzorcem (500 μ l TE pufra) smo tako pripravljenim redčinam spektrofotometrično določali absorbcijo svetlobe DNA (A_1) in stopnjo kontaminiranosti vzorca z proteini ali fenoli (A_2). Iz dobljenih meritev in razmerja med dvema absorbancama smo določili koncentracijo založnemu vzorcu in pripravili **delovno raztopino**, ki je vsebovala 5 ng/ μ l DNA, ki smo jo raztopili v končnem volumnu 300 μ l TE pufra.

3.2.4 Izbira mikrosatelitov in začetnih oligonukleotidov

Mikrosatelitne lokuse smo izbrali glede na rezultate predhodnih raziskav, ki so jih opravili Kavar in sod. (2002) z namenom, da bi ocenili genetske razlike med našimi avtohtonimi pasmami. Izbrali smo osem polimorfnih mikrosatelitnih označevalcev, kateri so navedeni v preglednici 3.

Preglednica 3: Seznam mikrosatelitnih označevalcev

Ime označevalca	Dolžine PCR produktov		Zaporedje začetnih oligonukleotidov (<i>angl. Primers</i>)
	Min.	Max.	
MAF214	181	250	5'- GGG TGA TCT TAG GGA GGT TTT GGA GG -3'
	181	250	5'- AAT GCA GGA GAT CTG AGG CAG GGA GG -3'
MAF65	124	142	5'- AAA GGC CAG AGT ATG CAA TTA GGA G -3'
	124	142	5'- CCA CTC CTC CTG AGA ATA TAA CAT G -3'
McM42	79	101	5'- CAT CTT TCA AAA GAA CTC CGA AAG TG -3'
	79	101	5'- CTT GGA ATC CTT CCT AAC TTT GGG -3'
McM527	168	178	5'- GTC CAT TGC CTC AAA TCA ATT C -3'
	168	178	5'- AAA CCA CTT GAC TAC TCC CCA A -3'
TGLA53 Govedo	116	136	5'- CAG CAG ACA GCT GCA AGA GTT AGC -3'
	116	136	5'- CTT TCA GAA ATA GTT TGC ATT CAT GCA -3'
OarAE119	144	181	5'- CTC AGC AAA TGG TTC CTG GGC ACC -3'
	144	181	5'- TTT TAT AGT GAG GTG ACC ACT TGA TG -3'
OarCP49	77	103	5'- CAG ACA CGG CTT AGC AAC TAA ACG C -3'
	77	103	5'- GTG GGG ATG AAT ATT CCT TCA TAA GG -3'
OarFCB11	119	142	5'- GGC CTG AAC TCA CAA GTT GAT ATA TCT ATC AC-3'
	119	142	5'- GCA AGC AGG TTC TTT ACC ACT AGC ACC -3'

V preglednici 3 so navedeni genetski označevalci (mikrosatelitni označevalci), možne dolžine PCR produktov, ter leva in desna zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabljali v verižni reakciji s polimerazo. Tukaj velja omeniti, da je bil mikrosatelit TGLA 53 razvit za govedo.

3.2.5 Verižna reakcija s polimerazo PCR (ang. *Polimerase chain reaction*)

Polimerazna verižna reakcija je *in vitro* metoda, s katero logaritemsko pomnožujemo fragmente DNA, ki jih želimo preučevati. Fragment, katerega pomnožujemo določata začetna sintetična oligonukleotida, ki s prileganjem na mesto vzorčne DNA določita rob fragmenta, ki se bo podvajal. Oligonukleotida sta komplementarna vsak enemu koncu na vzorčni DNA. Komplementarno verigo sintetizira encim DNA polimeraza in sicer od mesta na vzorčni DNA kamor se je vezal začetni oligonukleotid.

PCR reakcijsko mešanico smo pripravljali v ločenem prostoru, kjer ni nevarnosti kontaminacije s produkti predhodnih PCR reakcij in ostalih DNA molekul. Pripravili smo jo po postopku, ki je prikazan v preglednici 4.

Preglednica 4: PCR reakcijska mešanica

Koncentracije PCR reagentov	Količina reagenta / vzorec μL
Deionizirana H_2O (Sigma)	1,42
1 $\times$ Taq pufer (Feramentas)	1,00
25 mM MgCl_2 (Feramentas)	1,00
2 mM dNTP	1,00
0,25 μM 5' začetni oligonukleotid	0,25
0,25 μM 3' začetni oligonukleotid	0,25
0,4 enote polimeraze Ampli Taq (Ferments)	0,08
PCR mešanica skupaj	5,00
DNA (5 ng/ μl)	5,00
Celotna količina reakcijske mešanice	10,00

PCR reagente smo zmešali po naslednjem vrstnem redu:

- Reagente razen encima polimeraze smo pri sobni temperaturi odmrznili, na hitro ročno pretresli nato centrifugirali ter jih hranili na ledu. Pri pipetiranju posameznih komponent reakcije smo uporabljali filter pipetne nastavke, s čimer smo preprečili morebitno kontaminacijo z drugimi PCR produkti, ki so lahko prisotni v pipeti.
- Dodali smo vzorčne DNA v že naprej določene luknjice na mikrotitrski plošči.
- Da bi preprečili izhlapevanje v mikroprocesorsko vodenem termostatu smo vsakemu vzorcu dodali kapljico mineralnega olja.
- Mikrotitrsko ploščo z PCR vzorci smo centrifugirali v centrifugi Centric 322A (Tehtnica, Železniki, Slovenija).
- Tako pripravljene plošče smo vstavili v mikroprocesorsko vodeni ciklični termostat PTC – 100 (MJ Research, Watertown MA, USA) in uporabili ustrezen temperaturni program, ki se je začel z 5 min denaturacijo na 95 °C. Sledili so mu naslednji koraki:

2. korak: prehod nazaj na prvi korak z 1-kratno ponovitvijo,
3. korak: 15 s pri 95 °C,
4. korak: 30 s prileganje začetnih oligonukleotidov pri 60 °C,
5. korak: 1 min pri 72 °C,
6. korak: prehod na tretji korak z 13-kratno ponovitvijo,
7. korak: 15 s pri 95 °C,
8. korak: 30 s pri 52 °C,
9. korak: 1 min pri 72 °C,
10. korak: prehod na sedmi korak z 21-kratno ponovitvijo,
11. korak: 10 min pri 72 °C,
12. korak: konec programa pri 20 °C.

Cikel verižne reakcije s polimerazo je potekal po značilnem tristopenjskem temperaturnem profilu :

- **Denaturacija:** inkubacija pri temperaturi 95 °C omogoči ločevanje verige na vzorčni DNA.
- **Prileganje začetnih oligonukleotidov:** v tej fazi se denaturirana DNA ohladi na 53 °C, kar omogoči, da se začetni oligonukleotidi »pripnejo« na komplementarna mesta vzorčne DNA.
- **Sinteza komplementarne verige:** z dviganjem temperature na 72 °C **aktiviramo encim** DNA polimerazo katera sintetizira novo DNA verigo.

3.2.6 Preverjanje PCR vzorcev na agarozni gelski elektroforezi

Gelska elektroforeza je metoda za prepoznavanje, ločevanje in čiščenje fragmentov DNA. Ker je molekula DNA negativno nabita se pod vplivom enosmernega električnega toka giblje proti anodi (+). Pri tem je pomembna hitrost gibanja molekul DNA, ki je predvsem odvisna od njihove velikosti, oblike, gostote agaroznega gela v katerem potujejo in jakosti električnega polja. V našem primeru smo z gelsko elektroforezo preverjali uspešnost izolacije DNA in PCR reakcije na 2 % agaroznem gelu.

Za pripravo agaroznega gela smo potrebovali elektroforetski pufrer, ki nam je služil tudi kot elektrolitska raztopina v katero smo gel potopili. Pripravili smo ga po naslednjem postopku:

Preglednica 5: Priprava 1 litra 0,5 × TBE pufra

Deionizirana voda	950 ml
10 × TBE pufer	50 ml
Etidijev bromid	20 µl

Preglednica 6: Priprava 1 litra 10 × TBE pufra

0,5 M TRIS	60, 50 g
0,5 M borova kis.	30, 85 g
10 mM EDTA	3, 72 g
Deionizirana voda	Do volumna 1 liter

$$X \text{ g agaroze} = \% \text{ agarozni gel} \times \text{volumen } 0,5 \times \text{TBE}$$

$$X \text{ g agaroze} = 0,02 \times 300 \text{ ml } (0,5 \times \text{TBE}) = 6 \text{ g agaroze}$$

Enačba za izračun potrebne količine agaroze

... (1)

Agarozni gel smo pripravili po zgornji enačbi in sicer zamešali smo 6g agaroze (SeaKem LE agaroz, Cambrex) in 300 ml elektroforetskega pufra $0,5 \times \text{TBE}$. Mešanico smo zavreli v mikrovalovni pečici in jo za kratek čas ohlajali na mešalu. Nato smo jo vlili v elektroforetski model, vstavili glavničke in počakali, da se je gel pri sobni temperaturi strdil. Ko se je gel strdil smo pazljivo odstranili glavničke in gel potopili v elektroforetsko banjo z TBE pufrom, ki je moral pokrivati gel.

PCR vzorcem smo pred nanosom v gel dodali 5 -7 μl nanašalnega pufra (2 μl bromfenol modro v 30 % glicerolu in 5 μl H_2O). Tako pripravljeno zmes smo z pipeto prenesli v žepke na gelu in v zadnjega odpipetirali velikostni standard (*angl. DNA size marker*), ter vklopili usmernik električnega toka. Gele smo imeli pod napetostjo 150 V od 20 do 30 minut. Po končani elektroforezi smo gele fotografirali na UV transiluminatorju.



Slika prikazuje preverjanje uspešnosti izolacije vzorcev DNA, ki so bili vključeni v našo raziskovalno nalogo (203, 236, 110, 166 ...,). Vzorec št. 180 ni deloval, saj je mesto na katerem bi moral biti DNA material prazno. Takim vzorcem smo ponovili celotno izolacijo DNA.

Slika 7: Preiskus delovanja DNA

3.2.7 Genotipiziranje

Genotipizacijo smo izvedli z avtomatskim sekvenatorjem ABI Prism 310 (Perkin – Elmer Applied Biosystems, Foster City, ZDA). Omogočil nam je hitro in zanesljivo ločevanje

mikrosatelitnih lokaciji. Sekvenator podpira računalniška oprema Genescan, katera nam določi mikrosatelitne lokuse tako, da jih primerja s standardnimi fragmenti z znanimi velikostmi. Pri našem delu smo uporabljali stansard Gene scan Rox 350 (Perkin – Elmer), uporaben za ločevanje fragmentov velikosti od 35 do 350 baznih parov.

Sekvenator deluje na principu kapilarne elektroforeze. Vzorc potuje po kapilari proti anodi (+), ko doseže območje detekcije ga presvetli laser, ki vzbudi fluorescentne barvne značke. Barvne značke so barvila, ki so specifična za vsaki genetski označevalec. V našem primeru smo uporabljali FAM – modro, TAMRA – črno, JOE – zeleno barvilo. Ker aparat ABI PRISM™ 310 omogoča istočasno zaznavanje štirih različnih fluorescentnih barvil v eni kapilari, smo pri analizi združevali po štiri PCR produkte v dve mešanici, kateri sta vsebovali različno označene začetne oligonukleotide (Preglednica 7). Mešanico, ki smo jo nanašali na sekvenator smo pripravili z združitvijo 3µl PCR produkta štirih mikrosatelitnih označevalcev.

Preglednica 7: Mikrosatelitne označevalce, smo združili med sabo, glede na dolžino baznih parov

Mešanica 1		Mešanica 2	
FAM	MCM 42 (79 – 101) bp	OarCP 49 (77 – 103) bp	FAM
	TGLA 53 (116 – 136) bp	OarAE 119 (144 – 181) bp	
TAMRA	MAF 65 (124 – 142) bp	OarFCB11 (119 – 142) bp	TAMRA
	McM 527 (168 – 178) bp	MAF 214 (181 – 250) bp	JOE

Tako pripravljeno mešanico vzorcev združenih PCR produktov s štirimi mikrosateliti, smo hranili na mikrotiterskih ploščah. Pred nanosom v sekvenator smo odpipetirali 5 µl združene PCR mešanice v ABI reagenčno posodico, dodali 12 µl formamida in 0.4 µl standarda Rox 350. Po kratkem centrifugiranju smo vzorce za 3 min. denaturirali na 95 °C in jih takoj po tem postavili na led. Tako pripravljene vzorce smo razvrstili v sekvenator za genotipizacijo. Zbiranje podatkov in analizo genotipov smo izvedli z uporabo programske opreme GENESCAN Analysis Software, verzija 3.7.

3.2.8 Analiza genotipov z ATLASOM

Zbrane podatke v Excelu smo vnesli v program Atlas s katerim smo preverili ujemenje genotipov med starši in potomci. V primeru, ko smo preverjali rodovniške podatke oz. podatke, ki jih beležijo rejci sami, nam je Atlas podčrtal nezdružljive genotipe družin. To smo izvedli z orodjem kompatibilnost prednikov (ang.: *Parent compatibility*). Pri določanju očetovstva v tropu istrske pramenke, kjer smo imeli na razpolago 20 potencialnih plemenskih ovnov smo z orodjem predlaganje prednikov (ang.: *Propose parents*) potomcu avtomatsko določili ovna znotraj skupine potencialnih staršev. To program izvede tako, da določi koliko različnih genotipov obstaja med katerimkoli parom izmed izbranih primerkov. To se lahko izvede tudi ročno, vendar so takšni postopki zamudni in nagnjeni k napakam. Na koncu, ko so bili očetje določeni ustreznim družinam smo z orodjem izris rodovnika (ang.: *draw pedigree*) grafično predstavili izris genotipov osebkov in njegovih najbližjih sorodnikov (staršev, potomcev)(Perez in sod., 2004).

3.2.9 Statistična analiza mikrosatelitnih podatkov

Statistično analizo mikrosatelitnih podatkov somo izvedli z računalniškim programom GENETIX (Belkhir in sod., 1998). Preučili smo odnose med osebki znotraj populacij oz. zanimala nas je informativnost (polimorfnost) označevalcev za posamezne pasme.

Pomembna značilnost genetskega označevalca je njegova heterozigotnost, torej verjetnost, da je nek osebek heterozigoten za ta označevalec. Mera za informativnost označevalca nam pove pričakovan delež heterozigotnih osebkov. Večja kot je heterozigotnost bolj je označevalec informativen. Visoko polimorfni označevalec naj bi imel odstotek heterozigotnosti večji od 70 % (Ott, 1992).

Z namenom da bi določili stopnjo polimorfizma označevalcev pri pasmah smo izračunali frekvence alelov in delež heterozigotnosti. Pričakovani delež heterozigotnosti smo izračunali

iz števila posameznih alelov v populaciji glede na Hardy-Weinbergovo ravnotežje po naslednjem matematičnem obrazcu:

$H = 1 - \sum_{i=1}^K p_i^2$

K = število alel
Pi = pogostost i-te alele

Enačba za Hardy-Weinbergovo ravnotežje

... (2)

4 REZULTATI

Odvzete krvne in tkivne vzorce ovc, ovnov in njihovih potomcev smo izolirali s fenolkloroformsko ekstrakcijo (postopki so opisani v poglavju 3) ter jih z osmimi izbranimi mikrosatelitnimi označevalci pomnožili s polimerazno verižno reakcijo. PCR produkte smo združili v dve mešanici, v vsaki po štiri izbrane mikrosatelite, in jih tako pripravljene genotipizirali na kapilarnem sistemu elektroforeze (ABI prism 310). S pomočjo programske opreme GENESCAN smo vsakemu označevalcu odčitali velikosti alel v baznih parih ter genotipe vnesli v tabelo v programu Excel. Izpolnjeno in pripravljeno tabelo smo analizirali s pomočjo programa ATLAS, kateri nam je potrdil ali ovrgel domnevne sorodstvene zveze med potomci in njihovimi starši.

Na osnovi genotipiziranja smo dobili dva sklopa rezultatov:

- preverili smo poreklo pri jezersko-solčavski in oplemenjeni JS pasmi in primerjali rezultate z že znanimi rodovniškimi podatki,
- določili smo očetovstvo v tropu istrskih pramenk, kjer je v času parjenja prisotnih več plemenskih ovnov,
- ocenili smo informativno vrednost uporabljenih mikrosatelitnih označevalcev.

4.1 GENOTIPIZIRANJE POSKUSNE POPULACIJE

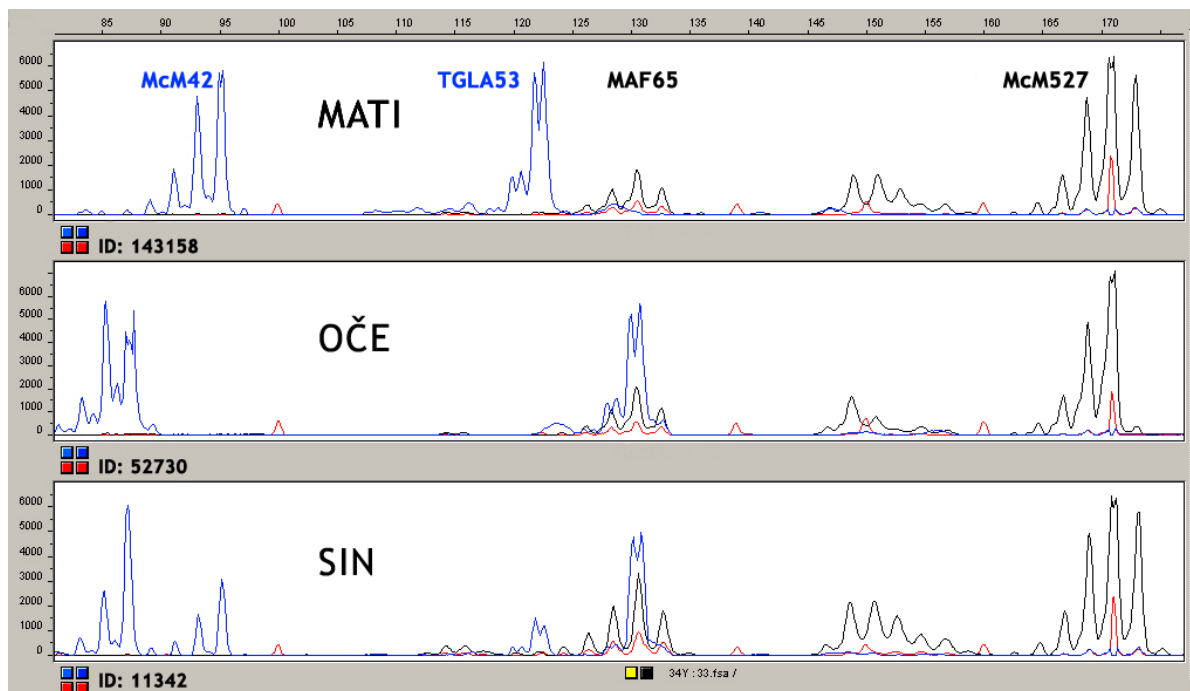
Genotipizacijo smo opravili z osmimi mikrosatelitnimi označevalci za 24 družin oplemenjene jezersko-solčavske pasme, 20 družin jezersko-solčavske pasme in štiri družine istrske pramenke (preglednica 8). Skupno smo genotipizirali 124 živali vzrejenih pri osmih rejcih. Posamezne lokacije reje živali, ki smo jih vključili v genotipizacijo so navedene v prilogi A.

Preglednica 8: Število genotipiziranih živali po pasmah in rejcih

REJEC	PASMA	Št. potomcev	Št. Mater	Št. očetov
Rejec 1	JSR	13	12	3
Rejec 2	JSR	9	8	1
Rejec 3	JSR	2	2	1
Rejec 4	JS	4	4	1
Rejec 5	JS	3	3	1
Rejec 6	JS	10	9	2
Rejec 7	JS	3	3	1
Rejec 8	IP	4	4	20

JS – jezersko-solčavska; JSR – oplemenjena JS; IP – istrska pramenka

4.1.1 Določanje velikosti mikrosatelitov na aparatu ABI PRISM™ 310

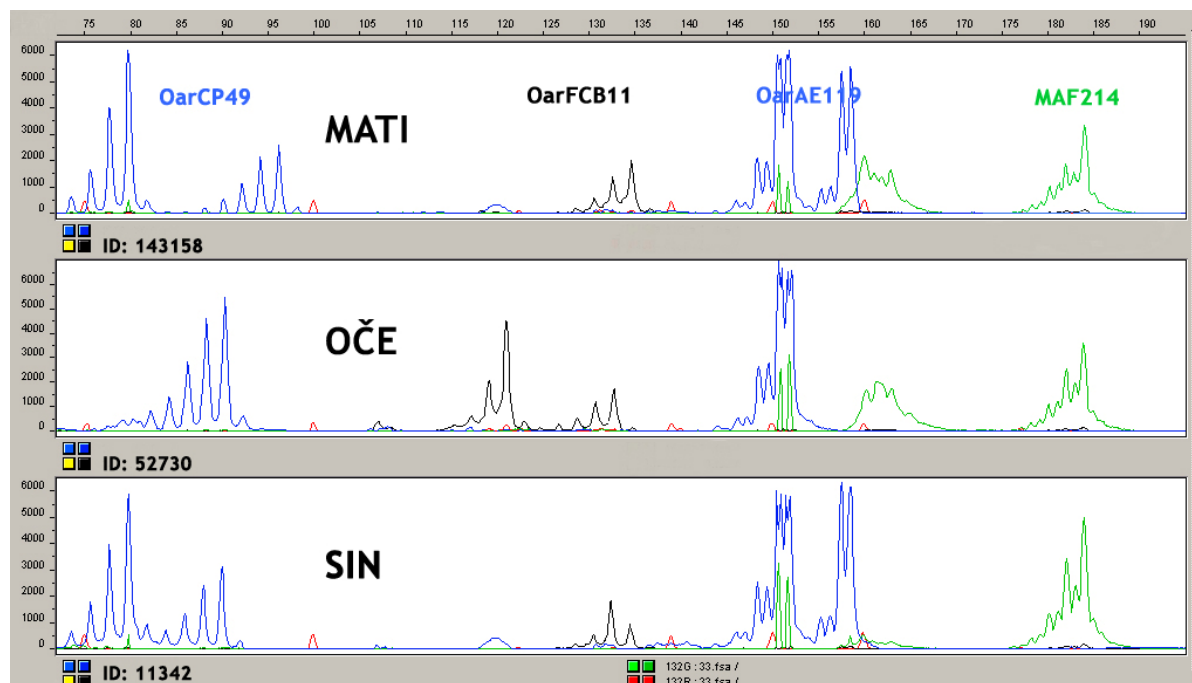


Slika 8: ELEKTROFEROGRAM. Primer genotipizirane družine Istrske pramenke za prvi set genetskih označevalcev McM42, TGLA53, MAF65, McM527

Z avtomatskim sekvenatorjem smo določili velikost alelov mikrosatelitnih lokusov za vse živali v raziskavi. Modri in črni vrhovi na sliki 8 prikazujejo alele osebkov izbrane ovčje družine, ki smo jih odčitali in s programom Excel vnašali v tabelo (preglednica 9). Za posamezni mikrosatelitni lokus se pojavljata dve alelni varianti, in tako dobimo 3 genotipske razrede, oba homozigotna in heterozigotni razred. Homozigot ima alela, ki sta oba enake dolžine in jih na elektroferogramu zaznamo kot en vrh (npr.: na Sliki 8 sta za lokus McM42 oba homozigotna MATI in OČE), medtem ko pri heterozigotu določimo oba alela, ki se razlikujeta v velikosti baznih parov oziroma dolžini fragmentov (npr.: SIN ima na lokusu McM42 oba alela, Slika 8 in Preglednica 9). Tako smo pri vsakem posamezniku na osmih mikrosatelitnih lokusih odčitali po dva alela, ki ju potomec podeduje, enega po očetu drugega pa po materi.

Preglednica 9: Primer genotipizirane ovčje družine istrske pramenke z osmimi mikrosatelitnimi označevalci. Preglednica prikazuje DNA profil matere, očeta in potomca. Številke pomenijo različne alelne oblike mikrosatelita na osmih lokusih v genomu. Potomec prejme od vsakega starša po en alel

	McM42		TGLA53		MAF65		McM527		OarCP49		OarFCB11		OarAE119		MAF214	
MATI	14	14	27	27	34	36	57	58	3	15	39	39	50	54	67	67
OČE	8	8	34	34	34	36	57	57	10	10	26	37	50	50	67	68
SIN	8	14	27	34	34	36	57	58	3	10	37	39	50	45	67	67



Slika 9: ELEKTROFEROGRAM. Primer genotipizirane družine Istrske pramenke za drugi set genetskih označevalcev OarCP49, OarFCB11, OarAE119, MAF214

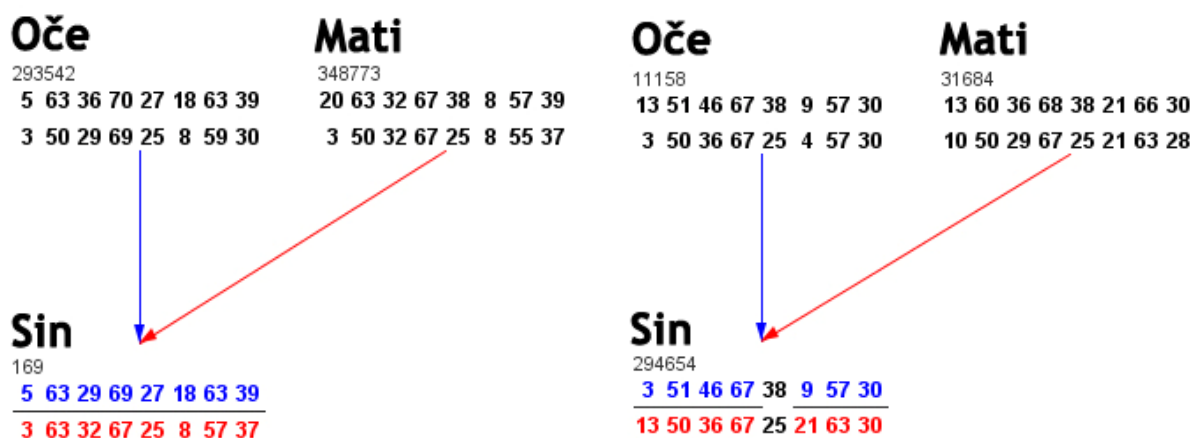
Pri drugem setu vzorcev so na Sliki 9 PCR produkti prikazani z modro (za lokusa OarCP49 in OarAE119), črno (OarFCB11) in zeleno bravo (MAF214). Rdeči vrhovi prikazujejo fragmente DNA znanih velikosti (Tamra 350, Perkin, Elmer). Genotipi posameznih živali so navedeni v prilogi B.

4.2 RODOVNIŠKA ANALIZA ZA JEZERSKO SOLČAVSKO IN OPLEMENJENO JS PASMO (ANALIZA POREKLA)

Z namenom, da bi preverili poreklo ovc, smo s pomočjo programa Atlas najprej testirali tiste živali, za katere smo imeli znano poreklo. Preverili smo rodovniške podatke, ki jih beležijo rejci sami ter podatke selekcijske službe. Oboje smo primerjali z rezultati, ki smo jih dobili pri genotipizaciji živali.

4.2.1 Živali s pravilnim rodovnikom

Po primerjanju genotipov potomcev na osmih mikrosatelitnih lokusih z genotipi staršev smo 40. primerom od 44-tih potrdili pravilno beleženje rodovniških podatkov. Ocenili smo, da so rejci drobnice v 9,1 % napačno vodili podatke ob rojstvu jagnjet. V enem od štirih napačno vodenih rodovnikov je bil potomcu nepravilno pripisan oče, v drugem mati, za ostala dva primera pa smo ugotovili, da sta bila jagnjetu napačno pripisana oba starša. 90,9 % beleženih rodovniških podatkov je bilo pravilnih, saj so se genotipi družin popolnoma ujemali z rodovniškimi podatki rejcev.

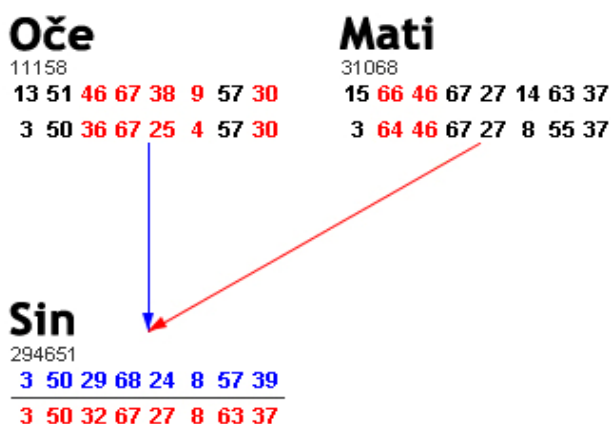


Slika 10: Slikovni prikaz rodovnika, ki ga za posamezno žival izriše program Atlas. Levo je prikazana jezersko-solčavska družina rejca 6, desno pa oplemenjena JS družina rejca 1. Vsaka žival je predstavljen z identifikacijsko številko npr. OČE rejca 6 ima ID 293542. S črnimi števili je pri starših obarvan genotip, ki ga določa osem mikrosatelitnih lokusov. Pri potomcu obarvana števila lokusov (števila baznih parov) prikazujejo alele, ki jih potomec podeduje po strani očeta (modra) in po strani matere (rdeče).

4.2.2 Neskladja testnih vzorcev

Ugotovili smo, da je bil štirim družinam od 44. pripisan napačen oče oziroma mati, saj se genotipi staršev z genotipom potomca niso ujemali. Pri dveh družinah smo opazili neskladja na šestih mikrosatelitnih lokusih, ostali dve družini pa se nista ujemali, prva na petih mikrosatelitnih lokusih, druga pa na štirih lokusih. Poleg tega petim družinam nismo uspeli določiti enega do dveh mikrosatelitnih lokusov. Razlog za to pripisujemo napakam v izolaciji oziroma slabi ločljivosti alelov pri določanju genotipa iz elektroferograma, tako da smo te lokuse pri vrednotenju rodovniških podatkov izključili, saj se je izkazalo, da so ostali lokusi dovolj informativni za določitev rodovnika tem družinam.

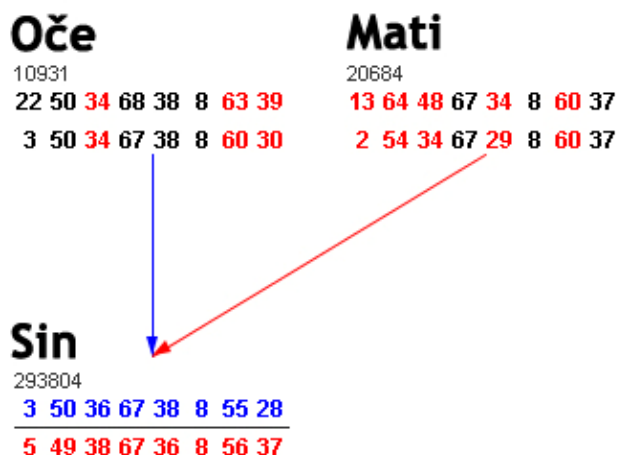
- Neskladje genotipov pri rejcu 1:



Slika 11: Primer neskladja genotipov starša z genotipom potomca pri rejcu 1

Rdeče označena števila pri očetu in materi na sliki 11 predstavljajo neujemanje genotipov očeta (11158) in matere (31068) z genotipom potomca (294651).

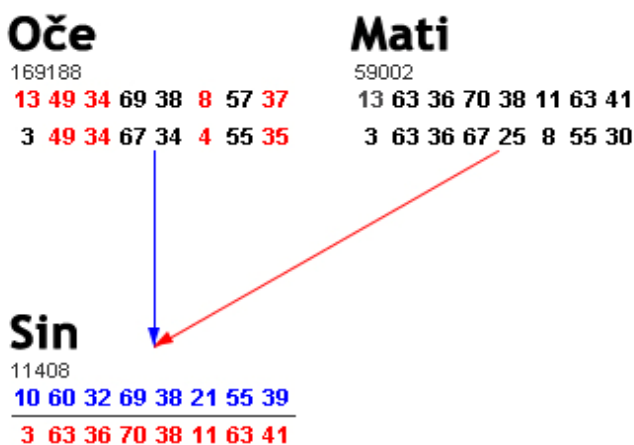
- Neskladje genotipov pri rejcu 3:



Slika 12: Primer neskladja genotipov starša z genotipom potomca pri rejcu 3

Rdeča števila na sliki 12 predstavljajo neujemanje genotipa očeta (10931) in matere (20684) z genotipom potomca (293804).

- Neskladja genotipov pri rejcu 5:

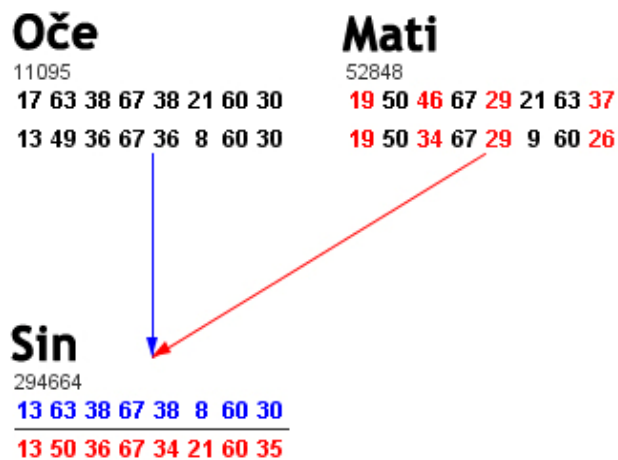


Slika 13: Neujemanje genotipa očeta z genotipom potomca pri rejcu 5

Na sliki 13 je predstavljen tipičen primer, kjer lahko predpostavimo, da je rejec naredil napako pri beleženju porekla, saj je potomcu št. 11408 pripisal napačnega očeta (169188). Napake te vrste se pojavijo pri rejcih, kjer je v čredi pri parjenju prisotnih več plemenskih ovnov hkrati. Pri rejcih z enim samim plemenskim ovnom, ki preprečujejo parjenje v sorodstvu, je verjetnost tega pojava možna ravno v času menjave plemenskega ovna z novim. Kritično

obdobje v tem primeru predstavlja čas menjave ovna, saj ne moremo 100 % določiti ovna, ki je v tem obdobju plodil.

- **Neskladja genotipov pri rejcu 2:**



Slika 14: Neujemanje genotipov matere z genotipom potomca pri rejcu 2

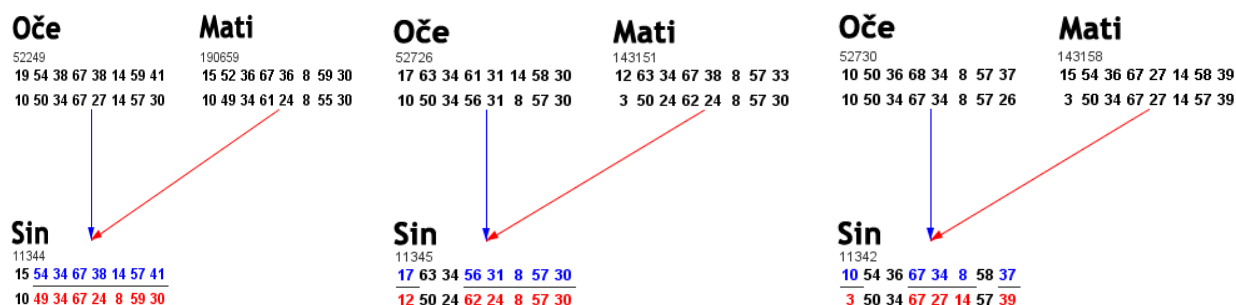
V slednjem primeru je bila pri rejcu 2 nepravilno pripisana mati (52848), saj se njen genotip na štirih lokusih ne ujema z genotipom potomca (294664). Napake te vrste niso ravno običajne, lahko pa predpostavimo, da se podobna neskladja dogajajo v času jagnjitev, ko so živali na paši, saj novorojeno jagnje lahko pomotoma pevezame neprava mati.

4.3 DOLOČANJE OČETOVSTVA ZA ISTRSKO PRAMENKO

V tem primeru je analiza temeljila na določanju očetovstva v čredi ovc istrske pramenke iz Centra za sonaravno rekultiviranje Vremščica, kjer v času paritev v čredo ovc pripuščajo dvajset plemenskih ovnov hkrati. Z namenom, da bi jagnjetom določili očete smo genotipizirali dvajset plemenskih ovnov na osmih mikrosatelitnih lokusih. Rezultate genotipov ovnov smo nato primerjali z rezultati genotipov štirih potomcev in njim pripisanih mater.

Ob primerjavi genotipov smo ugotovili, da z osmimi mikrosatelitnimi označevalci trem jagnjetom od štirih lahko določimo očeta z izločitvijo ostalih devetnajstih (slika 15). V enem primeru smo ugotovili, da set osmih označevalcev ni dovolj informativen za določitev očeta

potomcu 11346, zato smo analizo razširili in vanjo vključili dodatne štiri mikrosatelitne označevalce (preglednica 10).



Slika 15: Očetovstvo z osmimi mikrosatelitnimi označevalci smo določili trem potomcem IP

4.3.1 Dodatni set mikrosatelitnih označevalcev za določitev očetovstva potomcu 11346

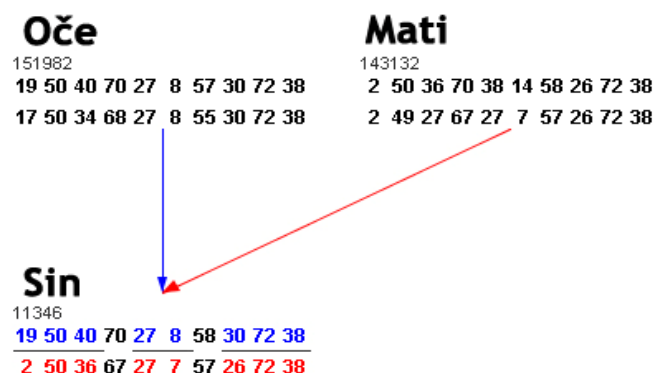
Da bi lahko jagnjetu 11346 določili očetovstvo z izločitvijo enega izmed dveh kandidatnih ovnov, katera ni bilo mogoče izločiti s standardnim setom osmih mikrosatelitnih označevalcev (preglednica 10), smo v analizo dodali še štiri označevalce OarCP20, Oar116, Oar109 ter Oar50 (preglednica 11).

Preglednica 10: Poiskus genotipizacije družine z osmimi lokusi ni bil uspešen, saj sta za možna očeta ostala še dva kandidata (Kan. 1 in 2)

ID		OarCP49	OarAE119	MAF65	MAF214	TGLA53	McM42	McM527	OarFCB11
11346	SIN	2 19	50 50	36 40	67 70	27 27	7 8	57 58	26 30
143132	MATI	2 2	49 50	27 36	67 70	27 38	7 14	57 58	26 26
11211	Kan. 1	3 19	49 50	40 42	62 70	27 36	7 8	55 57	30 39
151982	Kan. 2	17 19	50 50	34 40	68 70	27 27	8 8	55 57	30 30

Zaradi podobnosti v genotipu na osmih lokusih med ovnom 1 in 2 (preglednica 10; 11211 in 151982) lahko domnevamo, da obstajajo sorodstvene povezave med njima, kar je za majhno populacijo istrske pramenke zelo verjetno (predpostavimo lahko, da sta brata). Zaradi tega je bil set osmih lokusov premalo informativen, da bi lahko določili očetovstvo jagnjetu št. 11346.

Preglednica 11: Genotipi na dodatnih lokusih



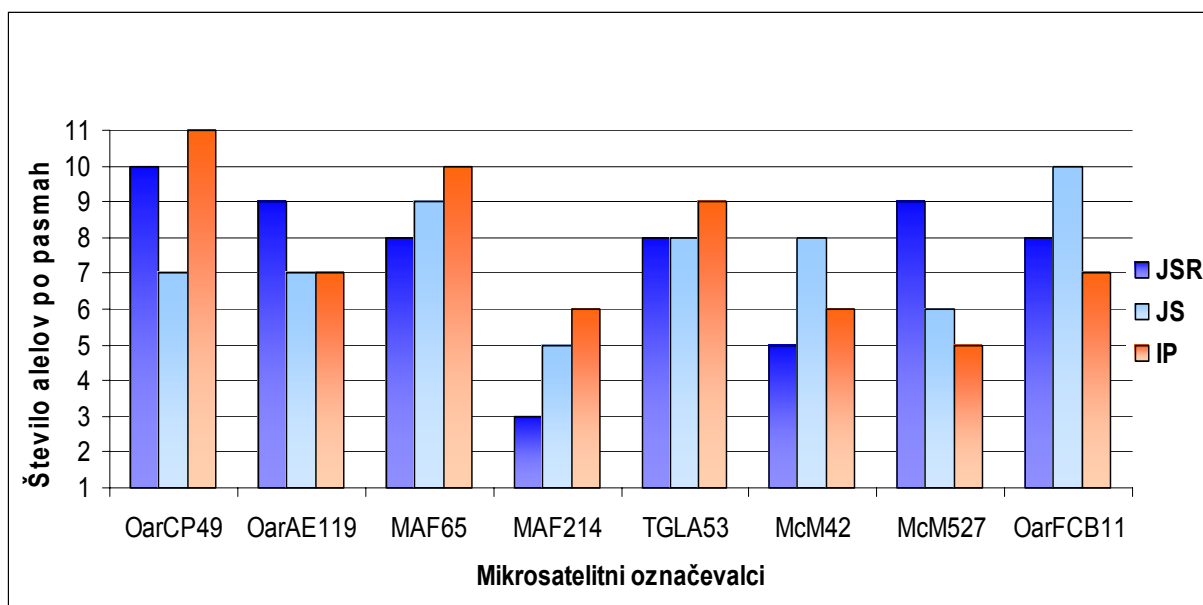
ID		OarCP20	Oar116	Oar109	Oar50
11346	SIN	72 72	38 38	73 75	76 76
143132	MATI	72 72	38 38	73 73	74 76
11211	Kan. 1	72 72	38 38	73 78	76 77
151982	Kan. 2	72 72	38 38	74 75	76 76

Slika 16: Uspešna določitev očeta z dvanajstim mikrosatelitnimi označevalci

Uporaba dodatnih štirih mikrosatelitnih lokusov se je izkazala za uspešno, saj smo potomcu 11346 izločili enega od dveh kandidatnih očetov, ter mu tako pripisali za očeta kandidatnega ovna 2 (št. 151982). Mikrosatelitni lokus Oar109 je izločil ovna 11211 in se tako izkazal za odločilnega (preglednica 11). Lokusa OarCP20 in Oar116 sta za to pasmo brez informativne vrednosti, zaradi homozigotnosti na vseh alelih. Z določitvijo očetovstva potomcu 11346 smo tako lahko določili očetovstvo vsem preiskovanim jagnjetom istrskih pramenk.

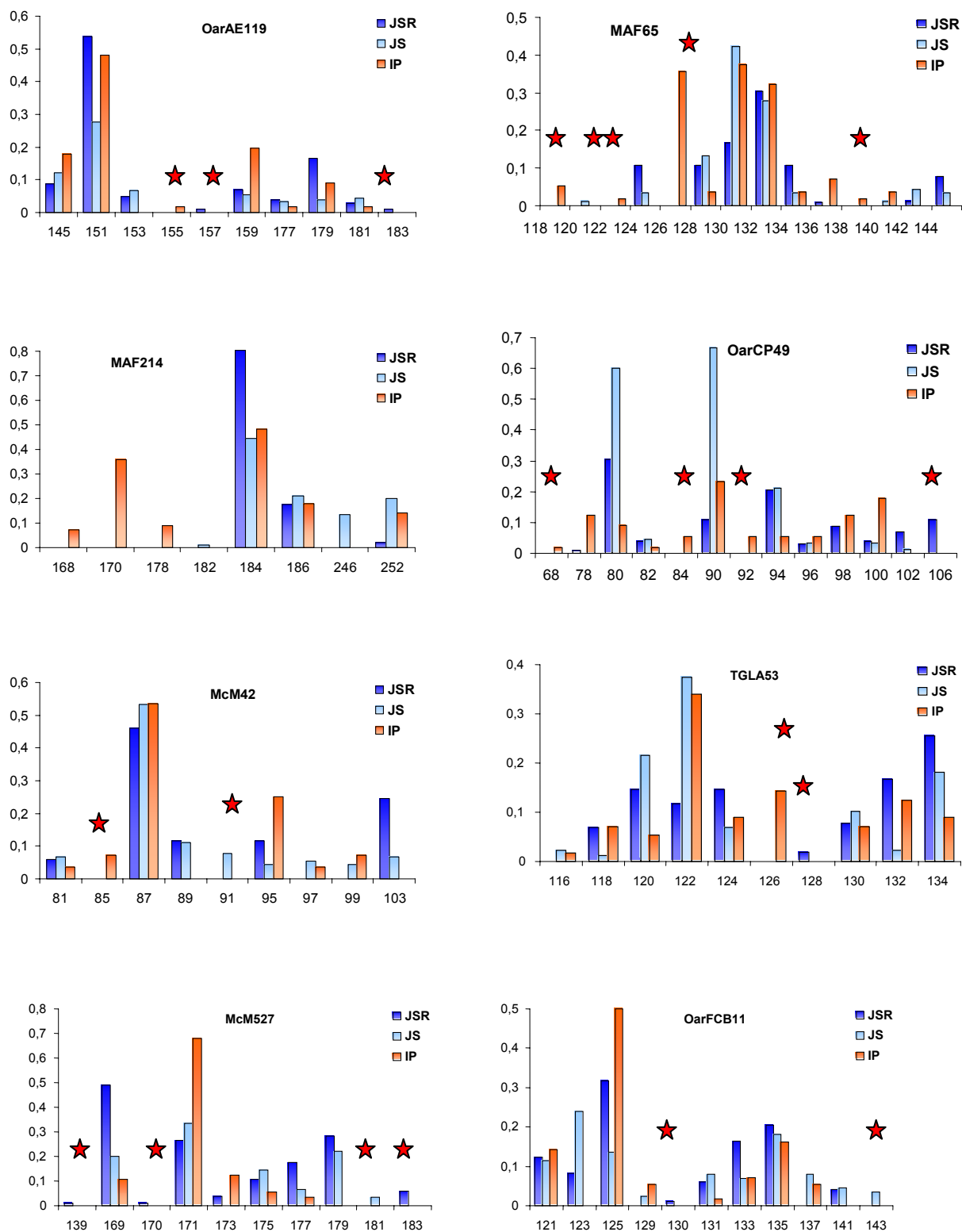
4.4 FREKVENCE ALELOV ZA POSAMEZNE MIKROSATELITNE LOKUSE PO PASMAH

V analizo frekvenc alelov smo vključili vseh osem mikrosatelitnih lokusov. Število alelov, ki smo jih za posamezen mikrosatelitni lokus našli pri določeni pasmi ovc je prikazano na sliki 17.



Slika 17: Število alelov za posamezne mikrosatelitne lokuse pri jezersko-solčavski (JS), oplemenjeni JS (JSR) in istrski pramenki (IP)

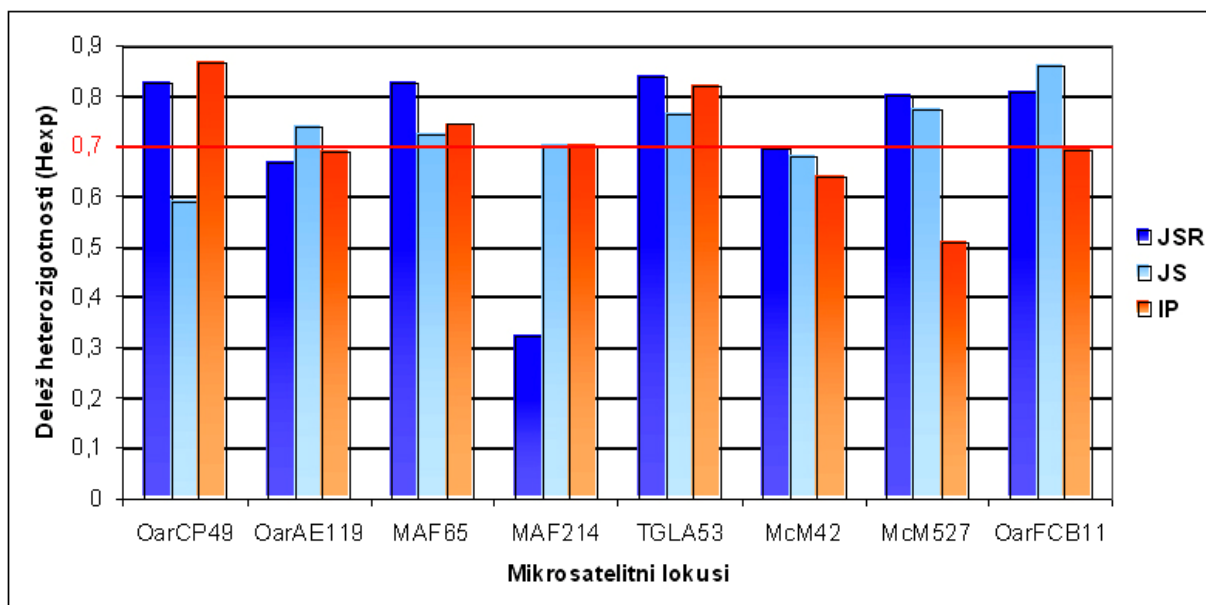
Na vsakem od preučevanih lokusov smo pri vseh treh pasmah našli večino alelov. Poleg tega smo identificirali od dva do pet za pasmo specifičnih alelov (imenovanih tudi privatni aleli), ki so na sliki 18 označeni z zvezdicami. Za istrsko pramenko je bilo za vseh osem lokusov ugotovljenih skupno trinajst privatnih alelov, osem za jezersko-solčavsko in šest za oplemenjeno jezersko-solčavsko ovco. Povprečno število alelov na mikrosatelitni lokus je za JSR znašalo 7,5, prav toliko za JS, za IP pa 7,63 alelov na lokus. Slika 20 prikazuje porazdelitev frekvenc alelov na posameznih mikrosatelitnih lokusih za vse tri pasme. Pogostost pojavljanja določenega genotipa na lokusu za pasme v analizi so predstavljene v prilogah 3, 4 in 5.



Slika 18: Frekvence alelov za posamezne mikrosatelitne lokuse; zvezdica označuje privatne alele

4.5 INFORMATIVNOST IZBRANIH MIKROSATELITNIH OZNAČEVALCEV

Z namenom določitve stopnje polimorfnosti in s tem informativne moči posameznih lokusov znotraj preučevanih pasem smo izračunali frekvence alelov in delež heterozigotnosti (za formule glej poglavje 3.2.9)



Slika 19: Povprečna heterozigotnost na lokusih pri jezersko-solčavski (JS), oplemenjeni JS (JSR) in istrski pramenki (IP)

Glede na povprečno heterozigotnost smo označevalce iz slike 19 razdelili v tri skupine:

- **Visoko polimorfni mikrosatelitni označevalci (heterozigotnost nad 70%)**

Za vse tri pasme ovc smo opazili visoko polimorfnost označevalcev na lokusu MAF65, TGLA53 in OarFCB11 (slika 19). Pri posameznih pasmah je bila visoka heterozigotnost opažena pri jezersko-solčavski pasmi s šestimi mikrosatelitni lokusi OarAE119 (0,74), MAF65 (0,72), MAF214 (0,7), TGLA53 (0,76), McM527 (0,77) in lokusom OarFCB11, kateri je imel pri tej pasmi največji delež heterozigotnosti in sicer 0,86. Prav tako šest lokusov z visokim deležem heterozigotnosti je bilo določenih pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi, ki je imela pet lokusov z deležem heterozigotnosti višjim ali enakim 0,8, in sicer

OarCP49 (0,83), MAF65 (0,82), TGLA53 (0,84), McM527 (0,8), OarFCB (0,8) in lokus McM42 s heterozigotnostjo 0,7. Pri istrski pramenki smo opazili pet lokusov v rangi višjega polimorfizma označevalcev. Lokus OarCP49, pri katerem smo zabeležili delež 0,86, kar je najvišji delež heterozigotnosti med vsemi lokusi, ter MAF65 (0,74), MAF214 (0,7), TGLA53 (0,82) in OarFCB11 (0,7).

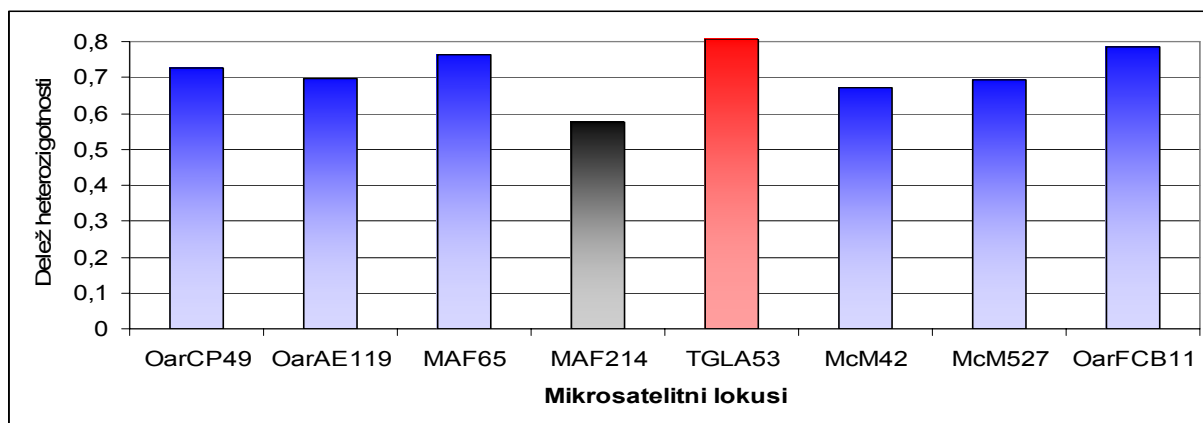
- **Srednje polimorfni mikrosatelitni označevalci (heterozigotnost od 50 – 69 %)**

Pri jezersko-solčavski pasmi smo v tej skupini zasledili dva lokusa, OarCP49 (0,59) in McM42 (0,68) (slika19). En sam lokus v tem razredu smo opazili pri oplemenjeni jezersko-solčavki, in sicer OarAE119 z deležem heterozigotnosti 0,66, medtem ko je v srednjem razredu polimorfizma istrska pramenka imela tri lokuse, OarAE119 (0,68), McM42 (0,63) in McM527 (0,51).

- **Nižje polimorfni mikrosatelitni označevalci (heterozigotnost od 0 – 50 %)**

V tem razredu imamo en sam lokus, in sicer zasledili smo ga pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi na lokusu MAF214 z deležem heterozigotnosti 0,32 (slika 19). Pri isti pasmi smo na istem lokusu zasledili le 3 alele (slika 17), kar je najmanjše število alelov na vseh lokusih.

4.5.1 Povprečna ocena informativnosti označevalcev za vse tri pasme



Slika 20: Povprečna heterozigotnost mikrosatelitnih lokusov za vse tri pasme skupaj

Najvišji nivo heterozigotnosti in s tem informativnosti lokusa smo pri vseh treh pasmah dosegli z označevalcem TGLA53 (slika 20), medtem ko se je za najmanj informativnega izkazal lokus MAF214. Lokusi OarCP49, OarAE119, MAF65 in OarFCB11 se pri teh treh pasmah uvrščajo v razred visoko polimorfni mikrosatelitov, visok delež heterozigotnosti imata tudi McM42 in McM527, ki za najvišjim razredom ne zaostajata veliko. Deleži heterozigotnosti za posamezne pasme so prikazani v prilogi F in G.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RODOVNIŠKA ANALIZA ZA JEZERSKO-SOLČAVSKO IN OPLEMENJENO JS PASMO

Rezultati izvedene analize kažejo, da se je izbira že preizkušenega seta osmih mikrosatelitov izkazala za dovolj informativnega za JS pasmo, pri JSR pa nekoliko manj saj smo iz seta izključili en označevalec zaradi njegove nizke informativnosti. Pri analizi smo odkrili neskladja zavedenih rodovniških podatkov kar kaže na napake pri vodenju rodovniških podatkov s strani rejcev drobnice. V prihodnosti bi veljalo te napake zmanjšati s pazljivim in natančnim beleženjem evidenc, vsaj pri tistih rejcih, kateri so vključeni v kontrolo porekla in proizvodnje za drobnico. Nekaj napak pa se lahko odkrije in odpravi z naknadno genotipizacijo kot prikazujemo v tej raziskavi.

5.1.1 Informativnost mikrosatelitov za JS in JSR populacijo

Prvi zaključek temelji na osnovi izračunanega povprečnega deleža heterozigotnosti mikrosatelitov za pasmo JS in JSR, kjer smo za dober označevalec definirali mejo heterozigotnosti pri 70-ih %. Tako smo pri JS in JSR pasmi za razred visoko polimorfni mikrosatelitov določili označevalce, ki so grafično predstavljeni v prilogi F.

5.1.1.1 Informativnost označevalcev za jezersko-solčavsko ovco

S standardnim setom osmih mikrosatelitnih označevalcev smo za JS populacijo dosegli željen delež 70 % heterozigotnosti (priloga F). V povprečju je ta znašal 73 % za vse označevalce skupaj, od tega smo sedem označevalcev uvrstili v razred visoko polimorfni mikrosatelitov, in sicer OarFCB11, ki se je s 86 % izkazal za zelo informativnega ter označevalci McM527 (78 %), TGLA53 (77 %), OarAE119 (74 %), MAF65 (72 %), MAF214 (70 %). Nekoliko manjši odstotek od mejne vrednosti heterozigotnosti je imel označevalec McM42 (68 %), ki ga lahko kljub temu uvrstimo v razred dobrih označevalcev. Mikrosatelitni označevalec OarCP49 se je z 59 % heterozigotnostjo uvrstil v srednje polimorfni razred, kar pomeni, da je njegova informativnost še dovolj visoka za uporabo pri določanju rodovništva.

5.1.1.2 Informativne lastnosti označevalcev za oplemenjeno jezersko-solčavsko ovco

V primerjavi z JS populacijo smo pri JSR populaciji z istim setom mikrosatelitov dobili različne rezultate za delež heterozigotnosti posameznih označevalcev, kar kaže da so genetske razlike med populacijama potencialno velike. Povprečni delež heterozigotnosti celotnega seta mikrosatelitov pa je tako kot pri JS ostal v visoko polimorfnem razredu s poprečno 72 % heterozigotnostjo. Pomembno vlogo za visoko povprečje je prispevalo pet mikrosatelitov, z deležem heterozigotnosti nad 80 %. Ti mikrosateliti so TGLA53 (84 %), OarCP49 (83 %), MAF65 (82 %) ter OarFCB11 in McM527 z 80 % heterozigotnostjo. V visoko informativni razred smo poleg omenjenih mikrosatelitov določili tudi označevalec McM42, ki je z 70 % dosegel mejno vrednost heterozigotnosti. V srednje informativni razred smo uvrstili označevalec OarAE119 z 67 % heterozigotnostjo. Mikrosatelit MAF214 z 32 % heterozigotnostjo je bil za JSR populacijo ovc najmanj informativen lokus v tem setu označevalcev. To se kaže tudi v številu alelov, ki jih lokus ima (slika 17), saj je s tremi aleli prispeval najmanj heterozigotnih genotipov v setu označevalcev. Ti dve ugotovitvi zadostujeta za izključitev označevalca MAF214 iz standardnega seta osmih mikrosatelitov in tako povečamo heterozigotnost seta iz 72 na 78 odstotkov.

Glede na rezultate, ki smo jih dosegli z omenjenimi označevalci lahko zaključimo z ugotovitvijo, da je za jezersko-solčavsko pasmo standardni set osmih označevalcev dovolj zanesljiv in hkrati informativen za določanje porekla pri tej pasmi. Za oplemenjeno jezersko-solčavsko pasmo predlagamo za nadaljne analize rodovništva uporabo seta sedmih mikrosatelitov, ki za to pasmo kažejo visoko stopnjo polimorfности. Mikrosatelit MAF214 pa zaradi slabe informativnosti za JSR pasmo ni primeren za uporabo. To bi dodatno pocenilo izvedbo analize.

5.1.2 Preverjanje rodovniških podatkov

Rezultati, ki smo jih dobili pri preverjanju rodovniških podatkov in za katere so zadolženi rejci ter kontrolorji, kažejo da prihaja pri vodenju rojstnih podatkov drobnice do napak. V štirih družinah od 44-ih (9,1 %), katere smo vključili v analizo porekla, smo po primerjavi

genotipov staršev z genotipi potomcev zasledili neskladja v rodovniku. Nepravilnosti rodovniških podatkov smo ugotovili pri štirih različnih rejcih od skupno sedmih vključenih v analizo. To bi hipotetično pomenilo, da iz vsakega drugega tropa vključenega v kontrolo porekla in proizvodnje lahko izhajajo osebkki z nepravilnimi rodovniškimi podatki. V dveh primerih, pri rejcu 1 in 3 (slika 11 in 12), smo ugotovili, da sta bila potomcu napačno pripisana oba starša, tako mati kot oče. Rejcu 1, pri katerem smo v analizi imeli 28 vzorcev živali (preglednica 8), smo kasneje dodatno primerjali genotip jagnjeta (294651) z genotipi preostalih živali, ki smo jih pri tem rejcu imeli na razpolago. Rezultat primerjave je pokazal, da jagnje v resnici pripada materi (31065) in očetu (11083) in ne staršem, kateri so mu bili ob rojstvu pripisani (Slika 21). Poleg tega smo ugotovili, da ima jagnje št. 294651 brata (294649) z enakim genotipom, zato lahko predvidevamo, da sta enojajčna dvojčka. Podobno smo poskusili tudi za rejca 3, vendar zaradi majhnega števila živali (5) vključenih v analizo, uspešnega rezultata nismo pričakovali in nam žal tudi ni uspel.



Slika 21: Levo je prikazan rodovnik jagnjeta 294651, taki kot mu je bil pripisan po rojstvu (pri očetu in materi so z rdečo barvo označena števila katera se ne ujemajo z genotipom potomca). Desno pa je predstavljen rodovnik, tako kot smo ga določili z analizo mikrosatelitnih lokusov

Razlogov, zaradi katerih prihaja pri vodenju rodovnika do napak, je veliko. Zavedati se moramo, da vseh ni mogoče preprečiti, saj meja do katere lahko fizično, s programi selekcije, posegamo je v naši analizi določljiva z 90,9 %. Za primer lahko navedemo, da je bilo po podatkih selekcijske službe za leto 2006 v kontroliranih tropih v Sloveniji vključenih 106 tropov JS pasme, pri kateri je registriranih 2.969 ovc, ki so imele 3.784 jagnjitev in 116 tropov

JSR pasme z 3.690 registriranimi ovci s 4.762 jagnjitvami. Največ jagnjitev je bilo zabeleženih v spomladanskem obdobju z vrhoma v mesecu marcu in maju, z okrog 2500 rojenimi jagnjeti na mesec (Zajc in Komprej, 2007). V velikih tropih to lahko predstavlja problem, saj na isti dan lahko jagnji več ovc hkrati. Posledice tega so lahko zamenjave med materjo in novorojencem, kjer jagnje vzredi ovca, ki v resnici ni njegova mati. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Laughlin in sod. (2003), ki smatrajo, da se enaki primeri največkrat dogajajo pri jagnjitvah na pašniku, kjer je nadzorovanje poteka jagnjitev omejeno. S podobnimi problemi se srečujejo tudi v tropih, kjer se pri pripustih uporablja več plemenskih ovnov hkrati. Konkretno pa bi za ta dva primera lahko predpostavili, da je bila napaka lahko storjena, ali pri beleženju rojstnih podatkov, ali pa upoštevamo možnosti, da je na isti dan jagnjilo več ovc, med katerimi je mati (31065) jagnjila dvojčka, eden od njiju (294651) pa se je pomešal z drugimi novorojenimi jagnjeti, zaradi česar ga je posvojila ovca, katera ni njegova prava mati. Rejec v tem primeru ni mogel predvideti, da jagnje pripada drugi materi in ga je avtomatsko pripisal materi, ki ni bila prava. Podobno bi lahko trdili tudi za rejca 2 (slika 14), ki je jagnjetu (294664) pripisal napačno mater (52848). Četrti primer neskladja genotipov smo ugotovili pri rejcu 5 (slika 13), za katerega vemo, da ima v tropu stalno prisotnega ovna, ki ga zaradi preprečevanja parjenja v sorodstvu vsakih nekaj paritvenih obdobji menjuje. Problem se pojavi ravno v času menjave enega plemenskega ovna z drugim, kjer nismo stoodstotni, kateri oven je v tem času plodil. Predvidevamo, da se je podobno zgodilo tudi rejcu 5, ki je jagnje (11408) pripisal očetu (169188), kateri se genotipsko s potomcem ne ujema.

Možnosti, da je prišlo do napake pri določanju genotipov ali pri našem vzorčenju tkiv, kar je prispevalo k neskladju rezultatov, tudi ne moremo povsem izključiti. Ker smo določali genotipe na več lokusih je možnost vpliva posamezne napake pri določanju genotipov majhna, saj neskladje navadno ugotovimo na več lokusih hkrati. Bolj verjetna bi bila napaka zaradi napačnega vzorčenja. Le ta je zaradi načina vzorčenja tudi malo verjetna, saj sta bila pri pregledu ušesne številke prisotna najmanj dva človeka – identifikaciji številke je takoj sledil odvzem vzorca. Obstaja sicer še možnost napačnega odčitavanja ušesne številke in napačni pripis laboratorijske številke posameznemu vzorcu. Torej, čeprav možnosti napak pri

vzorčenju in obdelavi vzorcev v laboratoriju ne moremo povsem izključiti, menimo, da je večina neskladij (9,1 %) posledica napak pri vodenju rodovnikov pri rejcih.

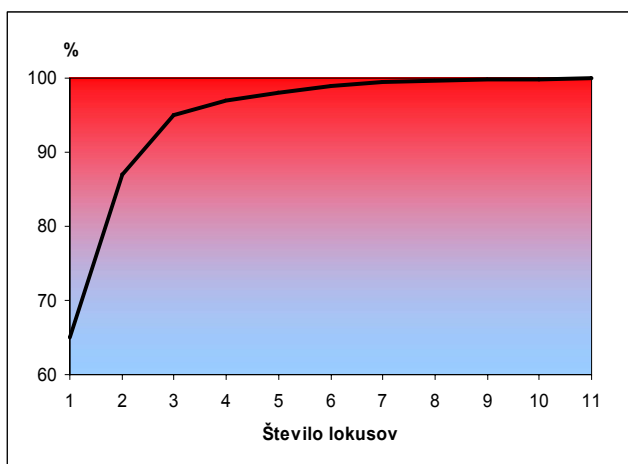
Zaključimo lahko z ugotovitvijo, da je uspešnost vodenja rodovniških podatkov s strani rejcev, ob pomoči selekcijskih služb, 90,9 %. Iz primerov je razvidno, da se nekatere napake s posegi v tehnologijo reje da odpraviti, nekatere pa bodo rejcem ostale prikrite. Zato se tu ponujajo alternativne metode ugotavljanja porekla, kot je uporaba molekularnih genetskih označevalcev, s katerimi bi ta odstotek približali 100 % in s tem dosegli pravilno vodenje rodovnika.

5.2 DOLOČANJE OČETOVSTVA ZA ISTRSKO PRAMENKO

V tropih, kjer se pri pripustih uporablja več plemenskih ovnov hkrati, so podatki o poreklu živali, zaradi nezmožnosti nadzorovanja pripustov osiromašeni s podatkom očeta. Zato v teh tropih predstavlja velik pomen, predvsem možnost nadzora rodovniških podatkov s pomočjo tipizacije DNA. Poleg tega pa je za rejce, ki so vključeni v kontrolo porekla in proizvodnje, pogoj, da so vse živali predstavljene z znanim poreklom. Tako smo štirim jagnjetom istrske pramenke, ki so bili leta 2005 odbrani za pleme, določali očetovstvo s standardnim setom osmih mikrosatelitov.

Rezultati deležev heterozigotnosti in števila alelov, kažejo da je stopnja inbridinga populacije istrske pramenke iz CSR Vremščice, podobna kot pri JS in JSR. To ugotovitev potrjujejo rezultati saj smo z osmimi mikrosateliti kateri omogočajo izločitev napačnih prednikov z 99 % verjetnostjo, dobili v povprečju 7,6 alela na lokus (slika 17), kar je največ od vseh pasem vključenih v raziskavo, heterozigotnost alelov pa je znašala 71 % (Priloga G). Poudariti pa je potrebno da je bilo v našo analizo zajetih za populacijsko-genetske študije še vedno relativno majhno število vzorcev in bi tako za bolj konkretne sklepe o inbridiranosti populacije IP morali analizirati večje število živali. Vendarle smo v enem od štirih družin odkrili višjo stopnjo sorodstva, kar lahko kaže, da znotraj pasme IP lahko obstajajo visoko inbridirane podpopulacije oziroma družine – v tem primeru je visoka stopnja sorodstva v tej družini istrske

pramenke privedla k zmanjšanju stopnje polimorfnosti mikrosatelitnih lokusov in s tem njihove informativnosti. V našem primeru smo problem rešili z uporabo dodatnih štirih mikrosatelitov, od katerih se je za ključnega izkazal lokus Oar109, pri katerem smo lokalizirali 4 alele. Toda ta podatek nam ne pove veliko, saj je bilo število živali v analizi za ta lokus, premajhno (štiri živali). Za nadaljne analize predlagamo, da se setu doda še najmanj en označevalec, kot prvega bi bilo na večjem številu plemenskih ovnov istrske pramenke smiselno analizirati prav lokus Oar109 in ugotoviti ali je njegova informativna vrednost dovolj visoka, da se ga vključi v standardni set mikrosatelitov. V primeru, da bi se izkazal dovolj kvaliteten, ga lahko zamenjamo z lokusom MAF512, saj s petimi aleli in 51 % heterozigotnostjo ni na nivoju ostalih označevalcev (Slika 19), ki sestavljajo standardni set mikrosatelitov. Slika 22 prikazuje kako s številom mikrosatelitnih lokusov povečujemo verjetnost izključitve napačnega očeta, vedeti pa moramo da teoretično nikoli ne dosežemo meje 100 odstotkov (Dovč, 1994).



Slika 22: Naraščanje verjetnosti uspešne izključitve napačnega očeta z dodajanjem mikrosatelitnih lokusov (prirejeno po Dovč, 1994)

5.3 KAJ NAM LAHKO PONUJAJO MOLEKULARNI OZNAČEVALCI NA PODROČJU OVČEREJE

V zadnjem času se v Sloveniji na področju selekcije v ovčereji vse bolj uveljavlja uporaba molekularno-genetskih metod. Molekularni podatki so dober pokazatelj variabilnosti v

populacijah, kar nam omogoča zasnovo programov za ohranjanje genetskih raznovrstnosti v populacijah živali (Dovč, 1996). Eden takih pristopov je prav gotovo tudi kontrola porekla z uporabo molekularnih markerjev, ki se je v Sloveniji že dobro uveljavila pri gospodarsko pomembnih domačih živalih (konji, govedo, prašiči, itd.). Kot vidimo se tudi pri drobnici srečujemo s čedalje strožjim selekcijskim nadzorom, zato so analize te vrste preiskušene v nekaterih primerih pa tudi uporabljene. Ker pa je v zadnjem času vse več populacij ovc vključenih v programe obveznega genotipiziranja za prionski gen (PrP), bi bilo žaljeno dodatno preverjanje porekla, vsaj po strani očeta. To je pomembno tako z vidika ocenjevanja plemenske vrednosti jagnjeta, kakor z vidika kontrole inbridinga, torej izogibanju nadaljnega parjenja v sorodstvu ter z vidika zanesljivejše genotipizacije za PrP lokus. Ker se bo v prihodnosti število genotipov na PrP lokusu še zmanjševalo, bo določanje porekla na podlagi samo PrP genotipov postalo neinformativno.

Poleg tega je potrebno poudariti, da kljub skrbi za natančno vodenje rodovniških knjig pri teh še vedno prihaja do napak. Da do tega v prihodnosti ne bo prihajalo se selekcijskim službam ponuja možnost nadzorovanja porekla z uporabo mikrosatelitnih označevalcev. V ta namen velja omeniti, da lahko postopek, s katerim smo izvedli analizo rodovništva še nekoliko posodobimo s pomnoževanjem večjega števila mikrosatelitnih lokusov hkrati v eni PCR reakciji. To nam omogoči hitro, cenejšo ter enostavno izvedbo genotipizacije. Podrobneje je multipleksiranje mikrosatelitov predstavljeno v poglavju 2.2.5. Zaključimo lahko z dejstvom, da uporaba visoko polimorfni DNA označevalcev omogoča učinkovito in objektivno preverjanje rodovniških podatkov, predvsem pomemben pa je podatek, da postajajo ta orodja vse pomembnejša pri projektih ohranjanja genetske raznovrstnosti.

6 POVZETEK

Izkaz o poreklu je dokument, s katerim lahko rejec drobnice izkaže poreklo svoje živali. V njem so poleg osnovnih podatkov (spol, pasma, datum rojstva..) podani še podatki rodovniške knjige (razvidno je poreklo živali za dve generaciji prednikov) ter genotip za PrP lokus.

Da bi v prihodnje zaupali predvsem rodovniškemu podatku, smo v prvem sklopu raziskave te podatke dodatno preverili z uporabo molekularnih genetskih označevalcev. V analizo smo vključili pasmi JS in JSR. Ugotovili smo, da je uspešnost beleženja rodovniških podatkov 90,9 %, to pomeni da smo pri štirih družinah od 44-ih zasledili neskladja pri primerjavi genotipov članov družin.

Drugi del molekularno genetske analize je temeljil na določanju očetovstva štirim potomcem istrske pramenke. V tem tropu pri pripustih plodi dvajset plemenskih ovnov hkrati in je določitev očeta jagnjetu, razen z mikrosatelitnimi označevalci, praktično nemogoča, vendar potrebna za vodenje rodovniške knjige. Z izbiro osmih visoko polimorfnih označevalcev smo uspešno določili očetovstvo trem jagnjetom, v enem primeru pa se je set označevalcev zaradi visoke stopnje sorodnosti, ki je v tem tropu prisotna izkazal za manj informativnega. V tem primeru smo dodali še štiri mikrosatelite in uspešno določili očetovstvo tudi za to jagnje.

Rezultati so pokazali, da je uporabljen set osmih visoko polimorfnih označevalcev (OarFCB11, MAF65, McM42, McM527, OarAE119, OarCP49, MAF214, TGLA53) dovolj informativen za jezersko solčavsko pasmo, pri oplemenjeni JS pa predlagamo izključitev označevalca MAF214, zaradi slabe informativne vrednosti. Za istrsko pramenko predvsem za trop iz CSR Vremščice svetujemo, da se analizira in doda še najmanj en označevalec. Zaključimo pa lahko, da je bil za to populacijo iz Vremščice z obveznim določevanjem očetovstva z mikrosatelitnimi označevalci, storjen velik korak pri ohranjanju te pasme, saj le tako lahko pričakujemo večjo genetsko pestrost, hkrati pa nadaljnjo ohranitev te pasme, ki je ogrožena.

7 VIRI

- Achmann R., Dworak E., Muller M., Brem G. 1998. Parentage control in Austrian domestic mountain sheep (*Ovis aries*) using DNA microsatellite analysis. *Animal Genetics*, 29, 1: 12-13
- Barut S. 2005. Molekularna analiza lokusa PrP pri slovenskih pasmah ovac. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 16-21
- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L., Bonhomme F. 1998. GENETIX. Logical sous Windows TM pour la genetique des populations. CNRS UPR 9060 University Montpellier, Laboratoire Genome et Populations
- Cotman M. 2007. »Določanje porekla z molekularnimi metodami pri Istrski pramenki«. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta (osebni vir, marec 2007)
- 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. 1996. Molekularna genetika v ovčereji. V: Možnosti razvoja reje drobnice v Sloveniji, Postojna, 27-29 nov. 1996. Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 93-98
- Dovč P., Kunej T., Snoj A. 2006. Molekularno genetska karakterizacija, molekularno biološki viri priznavanja novih pasem in linij domačih živali. Domžale, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko (neobjavljeno)
- Erčulj M. Farmakogenomika in genetska zdravila: Pirosekveniranje. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
www.ffa.uni-lj.si/index.php/content/download/1826/7090/file/Pirosekveniranje.pdf
(10. jul. 2007)
- Glowatzki-Mulis M.L., Muntwyle J. Gaillard C. 2007. Cost – effective parentage verification with 17- plex PCR for goats and 19-plex PCR for sheep. *Animal genetics*, 38, 1: 86-88
- GENDIA. 2007. Paternity. http://www.paternity.be/information_FR.html (13. sep. 2007)
- Goldstein D.B., Schlotterer C. 1999. Microsatellites: evolution end applications. Oxford, Oxford University Press: 352 str.
- 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. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 12 str.

- Kavar T., Kompan D., Dovč P. 2002. Genske razlike med istrsko pramenko, bovško ovco in jezersko solčavsko ovco. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, Zootehnika, Supplement 80: 192-201
- Kompan D., Erjavec E., Kastelic D., Kavčič S., Kermauner A., Rogelj I., Vidrih T. 1996. Reja drobnice. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 32-43
- Kompan D., Šalehar A., Holcman A. 1999. Ohranjene slovenske avtohtone domače živali. Domžale, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko: 39 str.
- Kompan D., Lotrič Žan M., Birtič D., Cividini A. 2006. Register pasem z zootehniško oceno, vrsta: ovce. http://www.bfro.uni-lj.si/Kat_center/genska_bank/Register2005/Ovce.pdf (28. mar. 2007)
- Laughlin A.M., Waldron D.F., Craddock B.F., Engdahl G.R., Dusek R.K., Huston J.E., Lupton C.J., Uckert D.N., Shay T.L., Cockett N.E. 2003. Use of DNA markers to Determine Paternity in a Multiple-Sire Mating Flock. American Sheep Industry. http://www.sheepusa.org/index.phtml?page=site/news_details&nav_id=fe6dfef3f426db0c74270baae708b648 (15. apr. 2007)
- Navodila in naloge rejcev sodelujočih v kontroli porekla in proizvodnje. 2006 Domžale, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko, Center za strokovno delo v živinoreji: 1-6
- Navodila kontrolorjem za opravljanje kontrole porekla in proizvodnje pri drobnici. Marec 2007. Domžale, Biotehniška fakulteta Ljubljana, Odd. za zootehniko, Center za strokovno delo v živinoreji: 1-7
- Ott J. 1992. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. Human genetics, 51: 283-290
- Perez-Encisio E., Perez-Encisio M., Garcia-Bernal P. 2004. Atlas. Perez Enciso, Miguel. <http://www.icrea.es/pag.asp?id=Miguel.Perez> (7. dec. 2006)
- Perše M., Horvat S., Rozman D. 2007. Genetski nadzor inbridiranih linij. Acta Agriculturae Slovenica (v tisku)
- Program strokovnih nalog selekcije in kontrole pri drobnici v letu 2004. 2003. Domžale, Biotehniška fakulteta Ljubljana, Odd. za zootehniko: 1-24
- Razpet A. 2004. Genetska raznolikost salmonidov v porečju Neretve. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 18
- Terčič D., Holcman A., Dovč P., 1996. Uporaba genetskih označevalcev v perutninski proizvodnji. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, Zootehnika, Supplement 68: 105-116

Zajc P., Komprej A. 2007. Plodnost ovc in koz v kontroliranih tropih v Sloveniji za obdobje 2006. Drobica, 12, 2: 7-9

ZAHVALA

Preden se zahvalim mentorju prof. dr. Simonu Horvatu, bi rad še nekaj dodal.

Od ideje, pa vse do realizacije diplomskega dela so minila približno tri kratka študijska leta. Prvi odvzem krvnega vzorca smo opravili v Logatcu 4. februarja 2005. Spomnim se tistega dne. Takrat nisem še dobro vedel, kaj vse se bo na tej poti, s tem vzorcem dogajalo, preden bo dobil mesto na tej strani. A nekaj me je gnalo, zanimalo. Če pomislim kaj je bilo krivo, zato da sem se odločil, za opravljanje diplomskega dela iz genetike se moram vrniti v prvi letnik, mislim da v učilnico Ro.5, kjer mi je bila snov predstavljena. Bili smo zanimiv razred neposlušnih študentov, ki smo pred drugimi razredi, zaradi vseh nas, malenkostno izstopali. A začuda je tisti dan v učilnici prvič govoril samo eden in edini. Spomnim se, da smo ga vsi poslušali.

Hvala vam prof. dr. Simon Horvat.

Zahvala gre tudi somentorju doc. dr. Dragomiru Kompanu in recenzentu prof. dr. Petru Dovču za natančen pregled in recenzijo dela.

Dr. Andreju Razpetu za izjemno strokovno pomoč in nasvete pri realizaciji laboratorijske analize.

Vsem rejcem še posebej pa njihovim ovcam, ki so tako ali drugače morale privolili v odvzem vzorca. Hvala vam. Domenu Drašlerju za pomoč pri zbiranju krvnih vzorcev in koščkov ušes.

Ljubitelju ovc in izjemnemu strokovnjaku na področju ovčereje Dušanu Birtiču za vse koristne nasvete, ki so mi in mi še bodo prišli prav pri reji. Birta legenda...

Za uvajanje v laboratorijsko delo Zali Prevoršek, Andreji Božič in gospe Vidi Štuhec. Zahvaljujem se tudi celotni ekipi zgornjega laboratorija. Gregorju Gorjancu, ki mi je bil v pomoč pri obdelavi podatkov.

Najlepša hvala gospe Sabini Knehtl, ki me je v času študijskih let nemalokrat potegnila iz zagate. Hvala tudi dr. Nataši Siard in gospe Karmeli Malinger za zadnjo piko.

Zato da ovce ne bodo pozimi lačne in za četrto opravljeno vzorčenje ter za vse modre besede se bom zahvalil prijatelju Egonu Štruklju – Šibelkoti. Klavdiji Kancler za vsa pojasnila, nasvete in moralno podporo pri reji drobnice in diplomski nalogi.

Da sem se izmikal študijskim obveznostim na faksu se moram zahvaliti Janiju Kutinu – Jazzbecu in ostalim sošolcem ter kolegom iz Rožne za vse zbluznjene dneve, predvsem noči. Lepo je blo.

Da sem iz brezupnega hiperaktivca postal »vzoren« študent gre zahvala mojima staršema. Mama in tata, hvala, da sta me na dosednji življenjski in ne le študijski poti finančno in

moralno podpirala. Predvsem pa se vama zahvaljujem za čisto kraško kri. Špela, da ne zmagujem v vojni edincev, se ti zahvaljujem za bratovščino.

Za lepe trenutke, potrpežljivost in ljubezen tebi Marjetka...

PRILOGE

Priloga A:

Seznam družin po pasmah in rejcih vključeni v raziskavo

Oplemenjena jezersko-solčavska

SIN	OČE	MATI	Rejec
ID	ID	ID	
294649	11083	31065	1
294651	11158	31068	1
294606	11223	31512	1
294653	11083	31534	1
294604	11223	31539	1
294650	11083	31602	1
294605	11083	31637	1
294601	11158	31644	1
294607	11158	31647	1
294603	11158	31681	1
294654	11158	31684	1
294647	11158	31075	1
294648	11158	31075	1
11417	11095	53174	2
294664	11095	52848	2
294660	11095	53474	2
294663	11095	53178	2
11421	11095	51904	2
11415	11095	53171	2
11422	11095	53187	2
11420	11095	52862	2
11419	11095	52862	2
293804	10931	20684	3
293801	10931	167900	3

1 - Zagožen

2 - Macerl

3 - Fotivec

Jezersko-solčavska

SIN	OČE	MATI	Rejec
ID	ID	ID	
245260	36089	36921	4
245258	36089	36918	4
245263	36089	36901	4
245261	36089	36908	4
11408	169188	59002	5
294613	169188	53839	5
294614	169188	52598	5
162	11309	348761	6
163	11309	348764	6
168	11309	348765	6
170	293542	348766	6
164	11309	348767	6
160	11309	348769	6
348776	11309	348769	6
167	11309	348770	6
165	11309	348771	6
169	293542	348773	6
303022	190781	213444	7
303023	190781	36085	7
303024	190781	36071	7

4 - Pečovnik

5 - Jovič

6 - Volčič

7 - Brglez

Istrska pramenka

SIN	OČE	MATI	Rejec
ID	ID	ID	
11346		143132	8
11344		190659	8
11345		143151	8
11342		143158	8
	143140		8
	143141		8
	11346		8
	53244		8
	10280		8
	10283		8
	11211		8
	52732		8
	53245		8
	151982		8
	52726		8
	52249		8
	10281		8
	11429		8
	114470		8
	52730		8
	11210		8
	143059		8
	11218		8
	52729		8

8 -Vremščica

Priloga B:

Pregled genotipiziranih mikrosatelitnih lokusov posameznih živali

Podatki o živali				Mikrosatelitni lokusi															
ID	Oče	Mati	Lok.	OarCP49		OarAE119		MAF65		MAF214		TGLA53		McM42		McM527		FCB11	
11223	0	0	1	90	106	157	159	130	144	184	184	124	130	87	87	171	179	121	130
11083	0	0	1	80	102	151	151	124	134	186	186	122	132	81	87	169	171	125	135
11158	0	0	1	80	94	151	153	132	142	184	184	120	134	81	89	171	171	125	125
294607	11158	31647	1	94	94	151	151	132	132	184	184	134	134	81	103	171	183	121	125
294603	11158	31681	1	94	106	151	153	124	142	184	184	134	134	81	103	171	183	123	125
294605	11083	31637	1	102	102	151	179	124	130	184	186	124	132	87	95	169	179	135	135
294604	11223	31539	1	106	106	159	179	144	144	184	186	130	132	87	95	179	179	121	121
294601	11158	31644	1	80	80	151	153	128	142	184	184	120	120	87	89	171	179	0	0
294606	11223	31512	1	90	90	151	159	132	144	184	184	124	124	87	103	175	179	121	133
31065	0	0	1	80	98	151	181	128	130	184	184	118	118	87	87	179	179	133	133
31068	0	0	1	80	96	181	183	142	142	184	184	122	122	87	95	169	179	133	133
31075	0	0	1	80	96	151	179	132	132	184	184	124	132	95	103	171	175	121	135
31512	0	0	1	90	106	151	159	132	132	184	184	124	128	87	103	175	175	133	135
31534	0	0	1	80	106	179	179	132	132	184	184	120	122	87	103	171	179	125	131
31539	0	0	1	94	106	151	179	142	144	184	186	124	132	87	95	179	179	121	131
31602	0	0	1	90	106	151	151	124	132	184	184	118	124	95	103	173	183	123	141
31637	0	0	1	98	102	151	179	128	130	184	184	124	132	87	95	179	179	123	135
31644	0	0	1	80	94	151	151	128	128	184	184	130	130	87	89	179	179	135	135
31647	0	0	1	90	94	151	177	132	132	184	184	124	134	95	103	175	183	121	141
31681	0	0	1	90	106	151	151	124	132	184	184	118	134	95	103	171	183	123	125
31684	0	0	1	90	94	151	177	124	132	184	186	120	134	103	103	179	183	123	125
294649	11083	31065	1	80	102	151	151	124	128	184	186	118	122	87	87	171	179	133	135
294653	11083	31534	1	80	106	151	179	124	132	184	186	122	122	87	103	171	179	125	135
294650	11083	31602	1	90	102	151	151	124	132	184	186	118	122	81	103	169	173	125	123
294654	11158	31684	1	80	94	151	153	132	142	184	184	120	134	89	103	171	179	125	125
294647	11158	31075	1	94	96	151	153	132	142	184	184	120	124	89	103	171	171	121	125
294648	11158	31075	1	80	80	151	179	132	142	184	184	124	134	81	103	171	175	121	125
294651	11158	31068	1	80	80	151	151	124	128	184	186	118	122	87	87	171	179	133	135
11420	11095	52862	2	80	98	151	179	128	134	184	184	130	132	87	103	171	177	125	125
11415	11095	53171	2	80	98	177	179	132	134	184	252	122	134	87	103	173	177	125	135
11417	11095	53174	2	98	100	145	151	132	134	184	184	134	134	87	89	175	177	125	133
11419	11095	52862	2	80	98	151	179	128	134	184	186	120	134	87	87	171	177	125	125
11422	11095	53187	2	94	98	145	151	130	132	184	184	120	134	87	89	177	177	125	141
11421	11095	51904	2	80	94	145	151	132	144	184	184	120	132	87	87	177	179	125	131
53174	0	0	2	80	100	151	151	132	134	184	186	134	134	87	89	171	175	131	133
53178	0	0	2	80	94	159	179	132	142	184	186	120	132	87	87	139	171	125	135
51904	0	0	2	80	82	151	179	130	144	184	184	120	120	87	89	175	179	131	135
53171	0	0	2	80	90	151	177	130	132	184	252	122	122	87	103	173	179	133	135
53187	0	0	2	90	94	151	151	124	130	184	184	120	132	87	89	171	177	125	141
52862	0	0	2	80	94	151	151	128	128	184	186	120	130	87	89	171	171	121	125
294664	11095	52848	2	94	94	151	179	132	134	184	184	130	134	87	103	177	177	125	131
294660	11095	53474	2	82	94	145	151	134	136	184	186	132	134	95	103	171	177	125	135
294663	11095	53178	2	94	98	145	159	132	142	184	184	132	134	87	103	171	177	0	0
53474	0	0	2	80	82	151	151	130	134	184	186	128	132	95	103	171	179	123	133

52848	0	0	2	100	100	151	151	130	142	184	184	124	124	89	103	177	179	121	133
11095	0	0	2	94	98	145	179	132	134	184	184	132	134	87	103	177	177	125	125
10931	0	0	3	80	106	151	151	130	130	184	186	134	134	87	87	177	179	125	135
20684	0	0	3	78	94	159	181	130	144	184	184	124	130	87	87	177	177	133	133
167900	0	0	3	80	102	145	179	130	130	184	184	132	134	87	95	175	179	125	135
293804	10931	20684	3	80	82	145	151	132	134	184	184	132	134	87	87	169	170	123	133
293801	10931	167900	3	80	80	145	151	130	130	184	186	132	134	87	87	175	179	135	135
36089	0	0	4	94	94	179	179	130	130	184	184	124	134	87	87	171	171	131	137
36921	0	0	4	80	90	145	179	132	134	184	184	124	124	89	89	171	175	123	123
36918	0	0	4	80	90	179	179	130	132	184	246	120	120	91	97	175	179	123	129
36901	0	0	4	80	94	151	179	134	140	246	252	116	120	87	91	169	171	121	131
36908	0	0	4	94	94	151	177	130	144	182	246	122	122	87	89	175	179	123	125
245260	36089	36921	4	90	94	145	179	130	132	184	184	124	134	87	89	171	175	123	137
245258	36089	36918	4	90	94	179	179	130	130	184	246	120	134	87	97	171	175	123	131
245263	36089	36901	4	80	94	179	179	130	134	184	246	120	134	87	87	171	171	131	131
245261	36089	36908	4	94	94	151	179	130	130	184	246	0	0	87	89	171	175	0	0
59002	0	0	5	80	94	179	179	132	132	184	252	120	134	87	91	169	179	125	137
11408	169188	59002	5	80	90	177	179	128	132	246	252	134	134	91	103	169	179	135	137
294613	169188	53839	5	80	82	145	159	130	130	186	246	120	130	87	87	171	179	133	137
294614	169188	52598	5	80	94	145	179	130	130	184	184	120	130	87	87	169	171	121	133
169188	0	0	5	80	94	145	145	130	130	184	246	130	134	81	87	169	171	131	133
52598	0	0	5	80	94	153	179	130	132	184	186	120	134	87	87	169	169	121	135
53839	0	0	5	82	94	151	159	130	132	184	186	120	120	87	87	169	179	131	137
164	0	348767	6	80	100	151	153	130	130	186	252	122	122	87	103	171	177	123	135
160	0	348769	6	80	80	159	181	130	130	186	252	120	122	87	87	169	171	123	125
348770	0	0	6	80	80	179	179	128	130	184	184	130	130	87	89	171	179	121	141
162	0	348761	6	80	100	153	181	132	132	186	252	122	122	87	87	169	179	125	135
348768	0	0	6	80	80	151	151	120	124	184	186	120	124	87	103	171	179	121	135
348766	0	0	6	80	80	151	151	130	132	184	186	122	134	81	87	171	175	123	135
348761	0	0	6	80	80	145	153	130	132	186	252	122	122	87	103	177	179	123	135
348772	0	0	6	80	80	151	151	130	132	184	186	118	122	87	89	171	179	123	141
169	293542	348773	6	80	82	179	179	124	128	184	246	120	122	87	99	171	179	133	135
168	0	348765	6	80	80	179	181	128	132	184	252	122	130	87	87	171	179	123	123
348765	0	0	6	80	80	179	179	128	142	184	186	122	122	87	103	177	179	123	141
348773	0	0	6	80	102	151	179	128	128	184	184	120	134	87	87	169	171	133	135
170	293542	348766	6	80	80	151	179	130	132	186	246	122	134	81	99	175	175	123	135
293542	0	0	6	80	82	151	179	124	132	246	252	120	122	87	99	175	179	125	135
167	0	348770	6	80	80	179	179	128	130	184	252	122	130	89	99	171	179	121	135
165	0	348771	6	80	80	151	179	128	130	186	252	122	122	87	95	171	175	125	125
348769	0	0	6	80	90	151	159	130	142	184	186	120	120	87	89	171	177	123	133
348764	0	0	6	80	96	159	179	132	144	186	186	116	134	81	97	171	175	131	137
348776	0	348769	6	80	80	151	181	130	142	184	252	120	122	87	89	169	177	123	123
163	0	348764	6	96	100	153	179	130	144	186	252	134	134	81	87	169	175	125	137
348767	0	0	6	80	96	145	151	130	130	184	252	122	122	87	103	171	179	135	135
348771	0	0	6	80	80	151	151	128	142	184	186	122	134	81	95	171	177	123	125
348763	0	0	6	80	80	153	179	128	130	184	186	130	130	87	87	169	171	121	123
190781	0	0	7	80	94	145	179	130	132	184	184	122	122	91	95	169	171	125	143
213444	0	0	7	94	94	145	151	132	132	184	252	122	122	87	87	169	179	123	143
36085	0	0	7	80	80	151	179	130	132	184	252	124	134	87	87	171	179	135	141

36071	0	0	7	80	94	151	179	128	130	184	252	122	132	87	97	181	181	121	129
303022	190781	213444	7	80	94	177	179	132	132	184	184	122	122	87	91	169	179	121	125
303023	190781	36085	7	80	80	145	151	132	132	184	184	122	124	87	91	169	171	125	135
303024	190781	36071	7	80	94	151	179	130	130	184	252	122	132	95	97	171	181	121	143
11346	0	143132	8	78	100	151	151	132	136	184	252	122	122	85	87	171	173	121	125
11344	0	190659	8	90	96	145	159	130	130	184	184	118	134	87	95	171	175	125	137
11345	0	143151	8	92	98	151	179	118	130	168	170	118	126	87	87	171	171	125	125
11342	0	143158	8	80	90	151	159	130	132	184	184	122	130	87	95	171	173	133	135
143132	0	0	8	78	78	145	151	122	132	184	252	122	134	85	95	171	173	121	121
143151	0	0	8	80	92	151	179	118	130	168	184	118	134	87	87	171	171	125	129
143158	0	0	8	80	96	151	159	130	132	184	184	122	122	95	95	171	173	135	135
190659	0	0	8	90	96	145	155	130	132	178	184	118	132	87	87	169	175	125	125
143140	0	0	8	78	98	145	177	128	132	184	184	122	122	87	95	171	173	129	135
143141	0	0	8	80	94	151	151	118	140	168	184	122	122	87	87	169	173	121	135
53244	0	0	8	100	100	151	151	130	136	186	252	130	132	87	99	171	177	125	125
10280	0	0	8	92	98	151	159	128	132	178	184	120	132	87	95	171	177	125	125
10283	0	0	8	100	100	151	159	132	134	178	184	122	124	95	97	171	171	125	125
11211	0	0	8	80	100	145	151	136	138	168	252	122	132	85	87	169	171	125	135
52732	0	0	8	84	100	151	181	130	132	186	252	124	124	81	99	171	171	125	125
53245	0	0	8	78	100	151	159	130	130	184	186	122	122	81	97	171	171	121	125
151982	0	0	8	98	100	151	151	130	136	186	252	122	122	87	87	169	171	125	125
52726	0	0	8	90	98	151	179	130	130	170	178	126	126	87	95	171	173	125	125
52249	0	0	8	90	100	151	159	130	134	184	184	122	134	95	95	171	175	125	137
10281	0	0	8	90	98	151	159	126	130	178	184	126	126	87	87	171	171	133	135
11429	0	0	8	78	82	145	151	132	132	184	252	120	122	87	99	171	171	129	135
114470	0	0	8	84	90	151	151	130	132	186	186	120	122	87	95	169	171	121	125
52730	0	0	8	90	90	151	151	130	132	184	186	130	130	87	87	171	171	121	133
11210	0	0	8	68	98	145	151	130	132	184	186	126	126	85	87	171	171	125	125
143059	0	0	8	84	90	159	159	126	140	184	186	116	124	95	99	169	171	125	133
11218	0	0	8	78	90	145	145	132	132	184	252	126	132	87	95	171	171	121	135
52729	0	0	8	90	90	145	159	132	132	184	186	132	132	87	87	171	171	125	125

Priloga C:

Pogostost pojavljanja genotipov na lokusih za oplemenjeno jezersko-solčavsko pasmo

Označevalec		JSR											
OarCP49	Genotip	2\13	3\3	3\5	3\10	3\13	3\15	3\17	3\19	3\20	3\22	5\13	10\10
	št.	1	3	3	1	6	2	4	1	3	3	1	1
	Genotip	10\13	10\20	10\22	13\13	13\15	13\17	13\22	17\19	17\20	19\19	20\20	22\22
št.	3	1	4	2	1	3	2	1	1	1	1	1	1
OarAE119	Genotip	49\50	49\54	49\63	50\50	50\51	50\54	50\60	50\63	50\64	53\54	54\63	60\63
	št.	6	1	2	13	5	2	3	10	1	1	3	1
	Genotip	64\66	63\63										
št.	1	1											
MAF65	Genotip	29\32	29\34	29\36	29\38	29\46	32\32	32\34	32\38	32\46	34\34	34\36	34\38
	št.	1	2	5	1	1	2	2	2	1	3	2	1
	Genotip	34\46	34\48	36\36	36\38	36\46	36\48	38\40	46\46	46\48			
št.	1	3	5	6	6	2	1	1	2				
MAF214	Genotip	67\67	67\68	67\70	68\68								
	št.	32	15	2	1								
TGLA53	Genotip	24\24	24\27	24\29	24\38	25\25	25\27	25\29	25\34	25\36	25\38	27\27	27\36
	št.	1	2	1	1	2	1	1	1	3	5	3	1
	Genotip	27\38	29\29	29\32	29\34	29\36	29\38	32\36	34\34	34\36	34\38	36\38	38\38
št.	1	2	1	2	4	2	1	1	2	1	6	5	
McM42	Genotip	4\8	4\9	4\21	8\8	8\9	8\14	8\21	9\21	12\21	21\21		
	št.	1	1	4	10	8	6	10	3	6	1		
McM527	Genotip	43\57	55\56	55\57	55\58	55\63	57\57	57\59	57\60	57\63	57\66	58\60	58\63
	št.	1	1	1	1	2	3	3	5	7	3	1	1
	Genotip	58\66	59\60	59\59	59\63	59\66	60\60	60\63	63\63	63\66			
št.	1	1	1	4	1	4	3	5	1				
OarFCB11	Genotip	26\26	26\30	26\34	26\35	26\37	26\39	26\45	28\30	28\37	28\39	28\45	30\30
	št.	4	1	1	1	2	1	1	4	2	1	1	5
	Genotip	30\35	30\37	30\39	30\45	35\37	35\39	37\37	37\39	39\39	71\71		
št.	3	1	7	2	1	1	3	3	3	2			

Priloga D:

Pogostost pojavljanja genotipov na lokusih za jezersko-solčavsko pasmo

Označevalec		JS											
OarCP49	Genotip	3\3	3\5	3\10	3\13	3\15	3\19	3\20	10\13	13\13	15\19	5\20	
	št.	16	3	4	10	2	2	1	2	4	1	1	
OarAE119	Genotip	49\49	49\50	49\51	49\54	49\63	50\50	50\51	50\54	50\60	50\63	50\64	51\63
	št.	1	3	1	1	4	4	1	2	1	9	1	3
	Genotip	51\64	54\63	54\64	60\63	63\63	63\64						
MAF65	Genotip	25\29	29\32	29\36	32\32	32\34	32\36	32\46	34\34	34\36	34\38	34\46	34\48
	št.	1	1	1	1	5	2	1	10	10	1	2	2
	Genotip	32\46	36\36	36\38	36\48	38\44							
MAF214	Genotip	67\67	67\68	67\69	67\70	68\68	68\69	68\70	69\70	65\69			
	št.	9	9	6	9	1	2	6	3	1			
	Genotip	23\25	23\38	24\27	25\25	25\27	25\29	25\34	25\38	27\27	27\29	27\34	27\36
TGLA53	št.	1	1	1	3	4	1	2	5	10	1	2	2
	Genotip	27\38	29\29	29\38	34\34	34\38	38\38	71\71					
	št.	3	1	3	2	1	2	1					
McM42	Genotip	4\8	4\14	4\18	8\8	8\9	8\11	8\14	8\16	8\18	8\21	9\9	9\18
	št.	3	1	1	13	7	4	1	2	2	5	1	1
	Genotip	4\16	11\14	11\16	11\21	14\16							
McM527	Genotip	55\55	55\57	55\59	55\60	55\63	57\57	57\59	57\60	57\63	57\64	59\59	59\63
	št.	1	8	1	1	6	2	7	3	9	1	1	3
	Genotip	60\63	64\64										
OarFCB11	Genotip	26\28	26\30	26\33	26\35	26\39	26\37	26\45	26\47	28\28	28\30	28\33	28\35
	št.	1	1	1	1	3	1	1	1	3	3	1	1
	Genotip	28\37	28\39	28\41	28\45	28\47	30\30	30\39	30\41	30\47	35\35	35\37	35\41
	št.	1	4	1	2	1	1	3	2	1	1	1	3
	Genotip	37\39	37\41	39\39	39\41	39\45	71\71						
	št.	2	1	1	1	1	1						

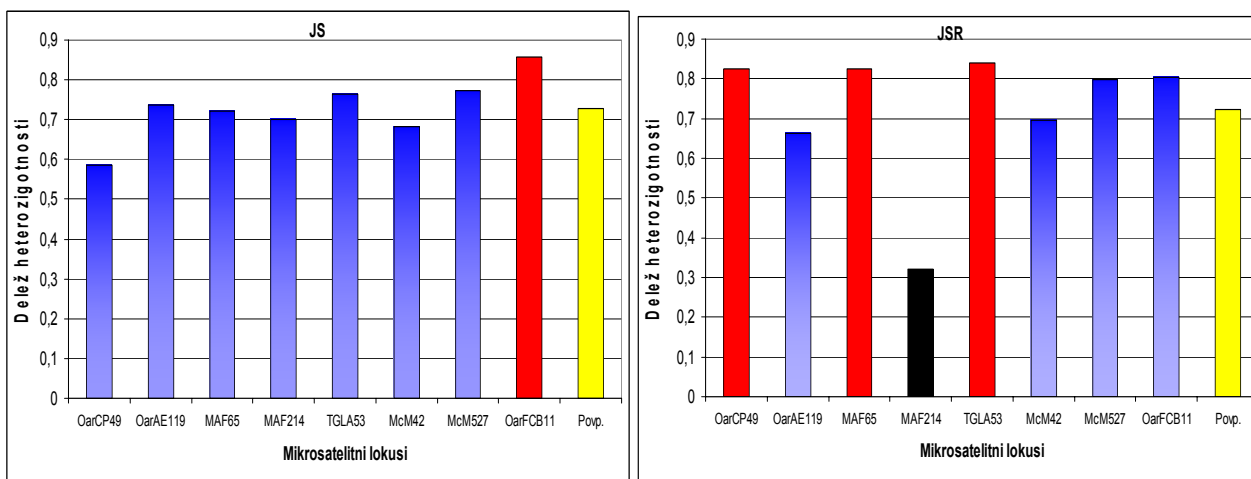
Priloga E:

Pogostost pojavljanja genotipov na lokusih za istrsko pramenko

Označevalec		IP												
OarCP49	Genotip	1\17	2\2	2\5	2\10	2\17	2\19	3\3	3\10	3\12	3\15	3\13	3\19	
	št.	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	
	Genotip	6\10	6\19	10\10	10\15	10\17	10\19	12\17	17\19	19\19				
	št.	2	1	2	2	2	1	2	1	2				
OarAE119	Genotip	49\49	49\50	49\52	49\54	49\60	50\50	50\54	50\63	50\64	54\54			
	št.	1	4	1	2	1	7	7	3	1	1			
MAF65	Genotip	24\34	24\44	27\36	29\32	31\34	31\44	32\36	34\34	34\36	34\38	34\40	36\36	
	št.	2	1	1	1	1	1	2	3	7	1	2	3	
	Genotip	36\38	40\42	36\40										
	št.	1	1	1										
MAF214	Genotip	56\61	56\62	61\67	62\67	62\70	67\67	67\68	67\70	68\68	68\70			
	št.	1	1	4	2	1	5	6	4	1	3			
TGLA53	Genotip	24\27	24\31	24\36	24\38	25\27	23\29	25\36	27\27	27\34	27\29	27\36	27\38	
	št.	1	1	1	2	2	1	1	6	1	1	1	2	
	Genotip	29\29	31\31	31\36	34\34	34\36	36\36							
	št.	1	3	1	1	1	1							
McM42	Genotip	4\16	4\1	7\8	7\14	8\8	8\14	8\18	14\14	14\16	14\18			
	št.	1	1	3	1	9	7	2	2	1	1			
McM527	Genotip	55\57	55\58	55\59	57\57	57\58	57\59	57\60	57\63					
	št.	4	1	1	11	6	2	2	1					
OarFCB11	Genotip	26\26	26\30	26\37	26\39	30\30	30\33	30\39	30\37	30\41	37\39	33\39	39\39	
	št.	1	3	1	2	10	1	1	1	2	3	2	1	

Priloga F:

Grafikona prikazujeta deleže heterozigotnosti za posamezne označevalce za pasmi JS (levo) in JSR (desno). Rdeče smo obarvali tiste označevalce, kateri so se izkazali za zelo informativne, medtem ko črno obarvani mikrosateliti za pasmo ne predstavljajo visoke informativne vrednosti. Rumeno obarvan stolpec predstavlja povprečje heterozigotnosti vseh lokusov za pasmo.



Priloga G:

Delež heterozigotnosti za posamezne označevalce za IP pasmo

