

UPORABA DNA OZNAČEVALCEV ZA PREVERJANJE POREKLA PRI OVCAH IN DOLOČANJA OČETOVSTVA V ČREDAH Z VEČ PLEMENSKIMI OVNI

Tomaž VOLČIČ^{1,2}, Drago KOMPAN³, Peter DOVČ⁴, Simon HORVAT⁵

Delo je prispelo 16. junija 2009, sprejeto 20. novembra 2009.
Received June 16, 2008; accepted November 20, 2009.

Uporaba DNA označevalcev za preverjanje porekla pri ovcah in določanja očetovstva v čredah z več plemenskimi ovni

Rodovniški podatki kontroliranih tropov so bistvenega pomena za rejce ovc in izvajanje selekcijskih programov. V tej študiji smo preverili, če je možno z osmimi molekularno genetskimi označevalci ter uporabo računalniškega programa ATLAS preveriti skladnost podatkov v več-generacijskih rodovnikih jezersko-solčavske in oplemenjene jezersko-solčavske pasme. Ugotovili smo 90,9 % točnost beleženja rodovniških podatkov, medtem ko smo neskladja ugotovili pri štirih družinah od 44-ih. V dveh primerih je bil potomcu nepravilno pripisan oče ali mati, pri ostalih dveh primerih pa 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. Trem jagnjetom smo lahko nedvoumno določili očeta z izločitvijo ostalih devetnajstih. V enem primeru smo ugotovili, da niz osmih označevalcev ni dovolj informativen za določitev očeta potomcu, zato smo analizo razširili in z vključitvijo dodatnih štirih mikrosatelitnih označevalcev uspešno določili očetovstvo tudi v tem primeru. Z izbranim nizom molekularnih označevalcev in obdelave podatkov je možno učinkovito preverjati obstoječe rodovniške podatke in napovedati očetovstvo jagnjetom v tropih, kjer pripuščajo večje število ovnov. Rezultati take analize so lahko v pomoč rejcem in selekcijskim službam za izboljšanje točnosti rodovniških podatkov in učinkovitejše načrtovanje reje in selekcije pri ovcah.

Ključne besede: ovce / poreklo / očetovstvo / molekularna genetika / genetski označevalci

Molecular genetics markers used for parentage verification and paternity determination in multiple-sire sheep pedigrees

Pedigree data from recorded flocks are of importance for the proper flock management as well as for the selection programmes and accurate performance prediction. In this study we examined if the use of eight molecular markers and computer analysis package ATLAS can be applied to verify known pedigrees of Jezersko-Solčava and Improved Jezersko-Solčava sheep breed from Slovenia. 90.9 % of pedigree data were in concordance with molecular genetic tests whereas in four pedigrees discordant parentage tests were obtained. In two cases, a different father or mother was assigned, whereas in the other two pedigrees both parents were discordant with molecular test results. In the second part of this study we aimed to determine the paternity for four 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 eight microsatellite markers, we were able to unequivocally determine paternity for 3 out of 4 lambs. In one case the analysis was not informative enough but with inclusion of 4 more microsatellite markers its sire could be determined. With the chosen set of microsatellite markers and data analysis programme ATLAS it is therefore 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. Applying such molecular tests could help sheep breeders in flock management and improve efficiency of selection programmes.

Key words: sheep / parentage / paternity / molecular genetics / genetic markers

1 Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija

2 Sedanji naslov: e-pošta: tomaz.volcic@go.kgzs.si

3 Isti naslov kor 1, doc. dr. e-pošta: drago.kompan@bfro.uni-lj.si

4 Isti naslov kor 1, prof., dr. e-pošta: peter.dovc@bfro.uni-lj.si

5 Isti naslov kor 1, izr. prof., dr. e-pošta: simon.horvat@bfro.uni-lj.si

1 UVOD

Preverjanje porekla, še zlasti očetovstva, z uporabo molekularnih označevalcev je relativno uveljavljena metoda pri nekaterih vrstah domačih živalih, kot so konji, govedo, psi in eksotične živali. 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. Velik pomen ima tudi pri laboratorijskih oziroma poskusnih živalih predvsem zaradi večje zanesljivosti in predstavljenosti rezultatov poskusa. 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 zapisan 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 kot nadzora inbridiranja, torej zaradi izogibanja nadaljnega parjenja v sorodstvu in zanesljivejše genotipizacije za PrP lokus.

Preverjanje porekla, gensko kartiranje, forenzične preiskave in genska diagnostika so le nekatere izmed možnosti za uporabo tipiziranja DNA (Dovč, 1994). 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 odsek v genomu, kjer obstajajo razlike v zaporedju nukleotidov v DNA. Na ravni populacije se ta variabilnost kaže v razlikah med osebkami znotraj populacije. Vendar razlike nimajo bistvenega vpliva na fenotip živali, kljub temu pa nam razkrivajo genetsko sorodnost med osebkami. Pomembne značilnosti, s katerimi ocenjujemo informativne genetske označevalce, so velika stopnja variabilnosti, enakomerna in številčna razporeditev po genomu ter enostavnost in cenenost identifikacije ter uporabe. Mikrosatelitni označevalci izpolnjujejo vse te zahteve, in sicer so visoko variabilni, številni, razporejeni so naključno po genomu ter relativno tehnično nezahtevni (Kavar in Dovč, 1999). Z uporabo sodobne tehnologije za analizo mikrosatelitov lahko postopke standardiziramo in avtomatiziramo ter tako hitro in enostavno pridemo do rezultatov. Pri od-

čitavanju genotipa (števila baznih parov) posameznega označevalca upoštevamo, da potomec podeduje dva alela, enega po očetovi, drugega pa po materini strani. Če posameznemu osebkmu združeno obravnavamo genotipe na več lokusih, dobimo sestavljen genotip, ki predstavlja molekularni opis osebkma na izbranih lokusih. S primerjanjem sestavljenih genotipov osebkov, ki so domnevno sorodstveno povezani, lahko sorodstvene zveze potrdimo ali ovržemo. Z uporabo večjega števila mikrosatelitov (8 in več) se zelo zmanjša verjetnost, da bi imela dva osebkma po naključju enak sestavljen genotip. S kombinacijo več visoko polimorfnihih lokusov lahko dobimo specifičen genotip za vsako žival, razen za enojajčne dvojčke ali visoko inbridirane linije (Kavar, 2001). Informativnost oz. polimorfnost označevalca v populaciji lahko predstavimo z vrednostjo PIC (*Polymorphism Information Content*), ki je odvisna od števila alelov na lokusu in porazdelitve alelov v populaciji.

Pri ovcah je doslej znanih že skoraj tisoč mikrosatelitov (<http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>) in so jih že uporabili v študijah preverjanja porekla (Achmann in sod., 1998). V čredah drobnice, kjer je pri parjenju prisoten en plemenski oven, običajno ne prihaja do rodovniških neskladij vsaj glede določanja očetovstva.. 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 lahko z leti dosežejo visoko stopnjo inbridiranosti, čigar posledice se lahko kažejo v slabši plodnosti, slabši proizvodnosti, pogostejšem pojavljanju raznih infektivnih in dednih bolezni, povezanih z večjo pogostostjo izražanja 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 bilo pri pripustih prisotnih več samcev hkrati. Ugotovitve raziskave kažejo, da so lahko ob primerjavi genotipov na treh mikrosatelitnih označevalcih lahko določili očeta 73 jagnjetom od 79 jagnjet (92 %), če so poznali tudi genotip matere. Kadar so bili genotipi označevalcev ocenjeni brez informacije genotipa matere, so lahko določili očeta 58 jagnjetom od 79 jagnjet (73 %). V tem primeru torej očetovstva niso mogli določiti pri 27 % potomcev.

Najnovejše raziskave pri genetskem kontroliranju porekla drobnice so usmerjene v pomnoževanje večjega števila mikrosatelitnih lokusov hkrati v eni PCR reakciji. Do sedaj so bile pri ovcah izvedene kontrole porekla z 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 (Glowatzki-Mulis in sod., 2007). Študija je uspešno dodelila posamezne živali pravi pasmi. Ocenjena verjetnost, da sta genotipa dveh naključno iz-

branih posameznikov iz populacije identična, je nihala med $5,23 \times 10^{(-7)}$ in $2,24 \times 10^{(-18)}$.

Leta 2004 je v Sloveniji 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 bili prvi poskusi genotipizacije z mikrosateliti usmerjeni na določanje genetske variabilnosti med avtohtonimi populacijami ovc ter identifikacijo osebkov in preverjanje porekla (Kavar in Dovč, 1999; Kavar in sod. 2002). Z namenom, da bi ocenili genetsko sorodnost med tremi slovenskimi avtohtonimi pasmami ovc, so Kavar in sod. (2002) z uporabo mikrosatelitov genotipizirali ovce istrskih pramenk, bovških ovc in jezersko solčavskih ovc (Kavar in sod., 2002). Rezultati kažejo, da razlike med pasmami niso zelo velike in da sta si bovška in jezersko solčavska ovca genetsko bližji kot istrska pramenka. 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). Zato predpostavljajo skupen nastanek vseh treh pasem oz. še posebej bovške in jezersko-solčavske ovce.

Našo raziskavo smo izvedli z namenom, da bi z uporabo molekularnih genetskih označevalcev preverili poreklo pri jezersko-solčavski in oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi ter primerjali rezultate z že znanimi rodovniškimi podatki. Ocenili smo tudi informativno vrednost osmih mikrosatelitnih označevalcev za istrsko pramenko in s programom ATLAS določili očetovstvo v tropu istrskih pramenk, kjer je v času parjenja prisotnih več plemenskih ovnov. Z analizo frekvenc alelov in stopnje heterozigotnosti pri istrski pramenki, jezersko-solčavski in oplemenjeni jezersko solčavski pasmi smo ocenili tudi informativnost uporabljenega niza mikrosatelitnih označevalcev.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 VZORČENJE

V študijo je bilo vključenih 24 družin (oče, mati in njuni potomci) oplemenjene jezersko-solčavske pasme, 19 družin jezersko-solčavske pasme in 4 družine istrske pramenke. Skupno smo genotipizirali 124 živali, vzrejenih pri osmih rejcih (pregl. 1).

Vsi potomci so bili vključeni v kontrolo porekla in proizvodnje za drobnico. Potomcem (odbrana moška ja-

Preglednica 1: Živali v študiji po pasmah in rejcih

Table 1: Animals used in the study listed by breed and breeder

| 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

gnjeta za testiranje), starim od 90 do 120 dni, je veterinar odvzel kri na karantenski postaji Horjul in testni postaji v Logatcu iz zunanje vratne vene (*v. jugularis externa*). Staršem, to je plemenskim ovcam in ovnom pri rejcih in Centru za sonaravno rekultiviranje Vremščica, smo s posebnim ščipalcem odvzeli majhen košček rovaša (približno 4 mm²).

2.2 IZOLACIJA DNA, IZBIRA MIKROSATELITOV IN VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO PCR

Odmrznjeni košček ušesnega tkiva smo po odstranitvi dlak lizirali z dodatkom 300 µl pufra za lizo s 5 µl proteinaze K (Kavar s sod. 2002). Vzorec smo inkubirali na 55 °C za najmanj 4 ure pri občasnem mešanju ter izolirali DNA s standardno fenolno ekstrakcijo ter alkoholno precipitacijo. Pri vzorcih krvi smo v reagenčne posodice odpipetirali 200 µl krvi in dodali 800 µl TE pufra. Raztopino smo centrifugirali 30 sekund na 12000g in supernatant odlili. Sediment smo ponovno resuspendirali v 800 µl TE pufra in prejšnji korak trikrat ponovili. Očiščeni celični sediment smo resuspendirali z 200 µl liznega pufra in 4 µl proteinaze K. Ostali del protokola je enak kot pri ekstrakciji DNA iz ušesnega tkiva.

Mikrosatelitne lokuse smo določili glede na predhodne študije (Kavar in sod. (2002) in izbrali osem polimorfnih mikrosatelitnih označevalcev (pregl. 2). PCR reakcijsko mešanico smo pripravili v ločenem prostoru, kjer ni nevarnosti kontaminacije s produkti predhodnih PCR reakcij in ostalih DNA molekul. Reakcijski pogoji so prikazani v preglednici 3.

Reakcijo PCR smo izvajali v mikrotiterskih ploščah v mikroprocesorsko vodenem cikličnem termostatu PTC – 100 (MJ Research, Watertown MA, USA) in uporabili program, ki se je začel z denaturacijo na 95 °C 5 min, sledilo je 13 ciklov denaturacije pri 95 °C 15 s, prileganja

Preglednica 2: Seznam uporabljenih mikrosatelitnih označevalcev, predviden razpon dolžin PCR produktov, ter zaporedja začetnih oligonukleotidov

Table 2: List of microsatellite markers, range of PCR product lengths and nucleotide sequences of both primers

| Ime označevalca | Dolžine PCR produktov | | Zaporedje začetnih oligonukleotidov (Primers) |
|-----------------|-----------------------|------|--|
| | 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 | 116 | 136 | 5' – CAG CAG ACA GCT GCA AGA GTT AGC –3' |
| Govedo | 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' |

začetnih oligonukleotidov pri 60 °C 30 s, in podaljševanja pri 72 °C 1 min ter 21 ciklov denaturacije pri 95 °C 15 s, prileganja pri 52 °C 30 s, in podaljševanja pri 72 °C 1 min, ter zaključnim podaljševanjem pri 72 °C, 10 min. Genotipizacijo smo izvedli z avtomatskim sekvenatorjem ABI Prism 310 (Perkin – Elmer Applied Biosystems, Foster City, ZDA). Ker aparat ABI PRISM™ 310 omogoča istočasno zaznavanje štirih različnih fluorescentnih bar-

vil v eni kapilari, smo pri analizi združevali po štiri PCR produkte v dve mešanici, ki sta vsebovali različno označene začetne oligonukleotide (pregl. 4). Mešanico, ki smo jo nanašali na sekvenator, smo pripravili z združitvijo 3 µl PCR produkta štirih mikrosatelitnih označevalcev. Pred nanosom v sekvenator smo odpipetirali 5 µl združene PCR mešanice v 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.

Preglednica 3: PCR reakcijska mešanica

Table 3: Reaction mixture for the PCR reaction

| Koncentracije PCR reagentov | Količina reagenta / vzorec, µL |
|--|--------------------------------|
| Deionizirana H ₂ O (Sigma) | 1,42 |
| 1 × Taq pufer (Fermentas) | 1,00 |
| 25 mM MgCl ₂ (Fermentas) | 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 (Fermentas) | 0,08 |
| PCR mešanica skupaj | 5,00 |
| DNA (5 ng/µl) | 5,00 |
| Celotna količina reakcijske mešanice | 10,00 |

2.3 ANALIZA GENOTIPOV S PROGRAMOM ATLAS IN STATISTIČNE OBDEALVE

Zbiranje podatkov in določanje genotipov smo izvedli z uporabo programske opreme GENESCAN Analysis Software, verzija 3.7. Zbrane podatke genotipov (alel smo označili kot velikost produkta PCR) v Excelu smo vnesli v program ATLAS (Perez in sod., 2004), s katerim smo preverili ujemanje genotipov med starši in potomci. 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 določili ovna znotraj skupine

Preglednica 4: Shema združevanja mikrosatelitnih označevalcev za analizo na sekvenatorju

Table 4: Pooling of microsatellite PCR products for genotyping

| Mešanica 1 / Mix1 | | Mešanica 2 / Mix2 | |
|-------------------|----------------------|------------------------|-------|
| 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 |

potencialnih staršev. 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, bratov, sester ipd.)

Da bi določili stopnjo polimorfizma označevalcev pri pasmah, smo izračunali frekvence alelov in delež heterozigotnosti z uporabo programa GENETIX (Belkhir in sod., 1998). Preučili smo odnose med osebkovi znotraj populacij oz. 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). Pričakovani delež heterozigotnosti smo izračunali iz števila posameznih alelov v populaciji glede na Hardy-Weinbergovo ravnotežje po naslednjem obrazcu:

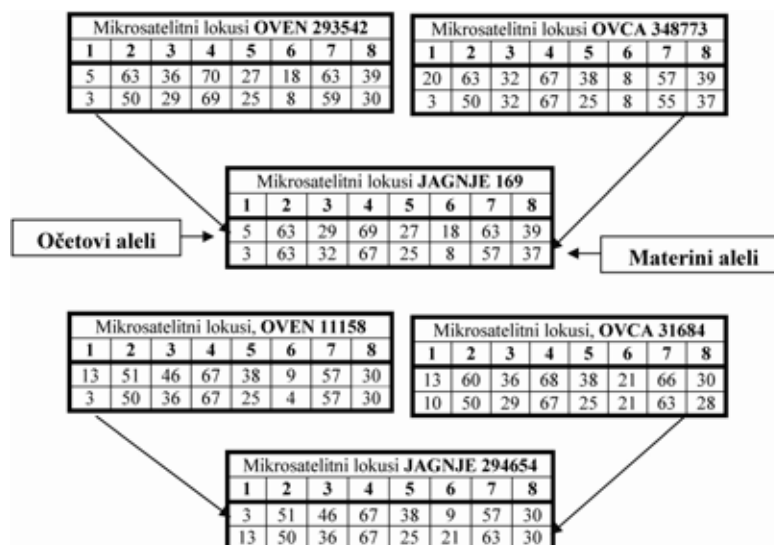
$$H = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

k = število alel
 p_i = pogostost i-te alele

3 REZULTATI

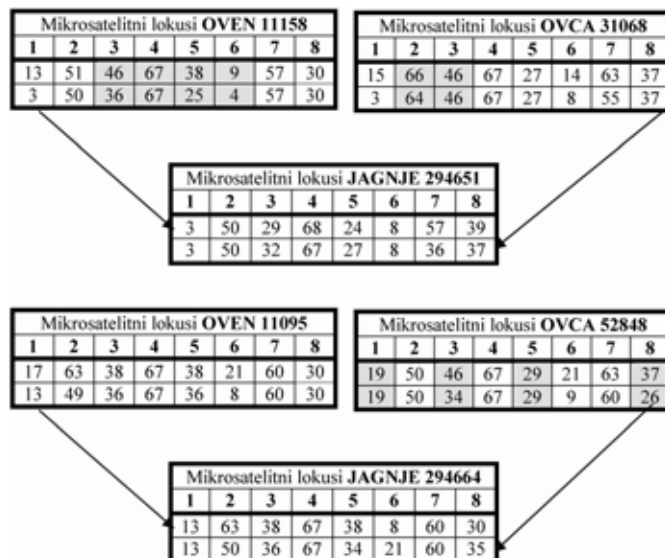
3.1 ANALIZA POREKLA ZA JEZERSKO-SOLČAVSKO IN OPLEMENJENO JEZERSKO-SOLČAVSKO PASMO

Z namenom, da bi preverili rodovniške podatke, smo s pomočjo programa ATLAS najprej testirali tiste živali, za katere smo imeli znano poreklo. Preverili smo rodovniške podatke, ki jih zapisujejo rejci sami ter podatke selekcijske službe. Oboje smo primerjali z rezultati, ki smo jih dobili pri testiranju genotipov. V 40-tih od 44-tih družin smo potrdili pravilno zapisovanje rodovniških podatkov. Na sliki 1(levo) je prikazana jezersko-solčavska družina rejca 6, desno pa oplemenjena jezersko-solčavska družina rejca 1. Vsaka žival je predstavljena z



Slika 1: Slikovni prikaz (program ATLAS) dveh rodovnikov, kjer je genotipska analiza potrdila pravilno zapisovanje rodovniških podatkov.

Figure 1: Scheme drawn by programme ATLAS for two pedigrees with concordant results between listed pedigree and genotype test.



Slika 2: Primer neskladja genotipov staršev z genotipom potomca pri rejcu 1 – jagnje je bilo pripisano napačni družini (zgoraj). V spodaj primeru je bila jagnjetu pripisana napačna mati. Osenčeni lokusi pri določenem osebkju predstavljajo neskladja genotipov med predvidenimi starši in potomcem.

Figure 2: A case of two pedigrees where genotype analysis demonstrated discordant results with enlisted pedigrees. Progeny of the left pedigree was assigned to a wrong family (shaded boxes), whereas progeny of the right pedigree was not assigned to correct dam.

identifikacijsko številko, npr. OČE rejca 6 ima ID 293542. Pri potomcu so za vsakega od osmih lokusov (alel prikazan kot število CA ponovitev) prikazani aleli, ki jih potomec podeduje po strani očeta (zgornja vrsta) in po strani matere (spodnja vrsta).

V 4 primerih od 44 –tih (9,1 %) smo odkrili razhajanja med rezultati genetske analize rodovnikov in zapisanih rodovniških podatkov. V dveh primerih sta bila potomcu nepravilno pripisana oče ali mati, pri ostalih dveh primerih pa sta bila jagnjetu napačno pripisana oba starša (slika 2). Pri dveh družinah smo opazili neskladja na šestih mikrosatelitnih lokusih, pri ostalih dveh družinah pa na petih oziroma štirih lokusih.

3.2 DOLOČANJE OČETOVSTVA ZA ISTRSKO PRAMENKO

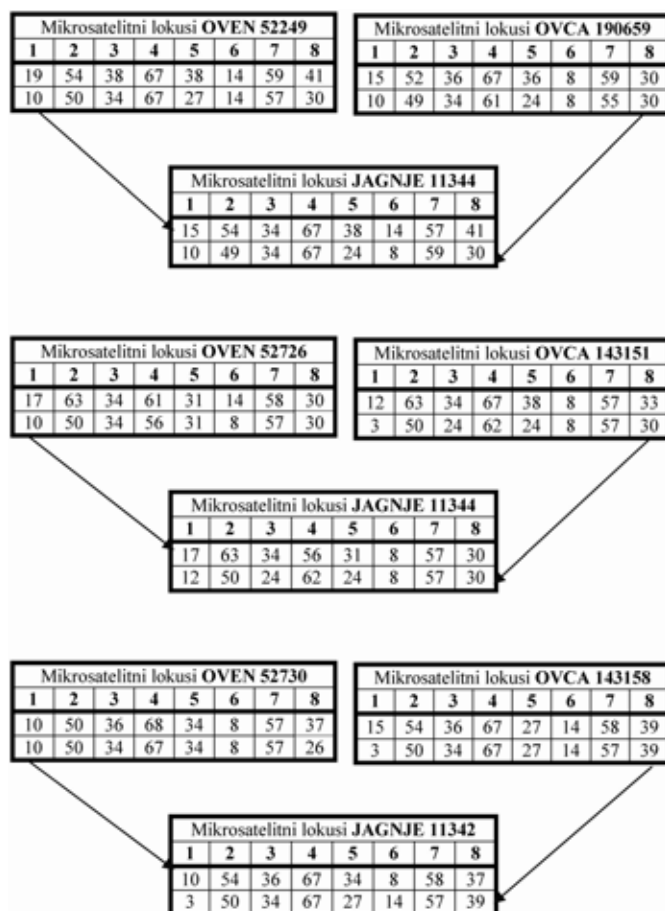
Analiza je temeljila na določanju očetovstva v čredi ovc istrske pramenke iz Centra za sonaravno rekultiviranje Vremščica, kjer v času paritev v čredo ovc pripuščajo dvajset plemenskih ovnov hkrati. Z namenom, da bi jagnjetom določili očete, smo genotipizirali dvajset plemenskih ovnov na osmih mikrosatelitnih lokusih ter rezultate primerjali z genotipi potomcev in njim pripisanih mater z uporabo programa ATLAS. Z osmimi mikrosateliti smo trem jagnjetom (št. 11344, 11345, 11342) lahko nedvoumno določili očeta izmed dvajset potencialnih očetov (slika 3).

Izbrani set osmih označevalcev ni bil dovolj informativen za določitev očeta potomcu 11346 (pregl. 5), saj je analiza s programom ATLAS od dvajsetih ovnov določila dva verjetna očeta. Da bi lahko jagnjetu 11346 kot očeta določili enega izmed dveh kandidatnih ovnov, smo v analizo dodali še štiri označevalce OarCP20, Oar116, Oar109 ter Oar50 (pregl. 6).

Zaradi podobnosti v genotipu na osmih lokusih med kandidatnima očetoma 1 in 2 (pregl. 5; 11211 in 151982) lahko domnevamo, da obstajajo sorodstvene povezave med njima, kar je za majhno populacijo istrske pramenke pričakovano (velika verjetnost je, da sta brata ali polbrata). Uporaba dodatnih štirih mikrosatelitnih lokusov je potomcu 11346 kot očeta nedvoumno določila kandidatnega ovna št. 151982 (pregl. 6). Mikrosatelitni lokus Oar109 je izločil ovna 11211 in se tako izkazal za odločilnega. 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.

3.3 ANALIZA FREKVENC ALELOV IN INFORMATIVNOSTI ZA POSAMEZNE MIKROSATELITNE LOKUSE PO PASMAH

V analizo frekvenc alelov smo vključili pasme jezersko-solčavska, oplemenjena JS in istrska pramenka



Slika 3: Uspešno določanje očetovstva (od 20 možnih) z osmimi mikrosatelitnimi označevalci trem potomcem istrske pramenke.
Figure 3: Successful assignment of the sire out of 20 potential fathers to three progeny.

ter osem mikrosatelitnih lokusov. Število alelov, ki smo jih za posamezen mikrosatelitni lokus našli pri določeni pasmi ovc, je prikazano na sliki 4. 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 (tako imenovani privatni aleli). 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 OPLEMENJENA JEZERSKO-SOLČAVSKA znašalo 7,5, prav toliko za JS, za IP pa 7,63 alelov na lokus.

Z namenom določitve stopnje polimorfnosti in s tem informativne moči posameznih lokusov znotraj preučevanih pasem smo izračunali delež heterozigotnosti. Glede na povprečno heterozigotnost smo označevalce (slika 4) razdelili v tri skupine, visoko polimorfne (heterozigotnost nad 70 %), srednje polimorfne (heterozigo-

Preglednica 5: Rezultati genotipizacije družine z osmimi lokusi, ki prikazuje dva možna očeta
Table 5: Raw genotype data for eight markers that could not distinguish amongst two potential fathers

| 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 |
| | Kandidatni | | | | | | | | |
| 11211 | oče 1 | 3 19 | 49 50 | 40 42 | 62 70 | 27 36 | 7 8 | 55 57 | 30 39 |
| | Kandidatni | | | | | | | | |
| 151982 | oče 2 | 17 19 | 50 50 | 34 40 | 68 70 | 27 27 | 8 8 | 55 57 | 30 30 |

Preglednica 6: Genotipi na dodatnih lokusih za potomca 11346**Table 6:** Genotyping for four additional markers for progeny number 11346

| 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 |

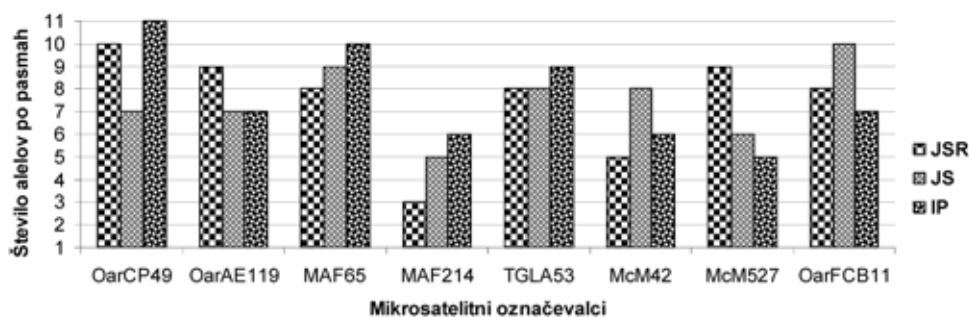
tnost med 50–70 %) in nižje polimorfne (heterozigotnost od 0–50 %). Za vse tri pasme ovc smo opazili visoko polimorfno označevalcev na lokusu MAF65, TGLA53 in OarFCB11 (slika 5). Pri posameznih pasmah je pri jezersko-solčavski izstopal lokus OarFCB11 ($H=0,86$), pri oplemenjeni jezersko-solčavski lokus TGLA53 (0,84) in pri istrski pramenki lokus OarCP49 (0,86). V skupino srednje polimorfni sta se pri jezersko-solčavski uvrstila

lokusa OarCP49 (0,59) in McM42 (0,68), pri oplemenjeni jezersko-solčavski lokus OarAE119 (0,66), medtem ko smo pri istrski pramenki zabeležili tri lokuse OarAE119 (0,68), McM42 (0,63) in McM527 (0,51). V najmanj informativni skupini mikrosatelitnih označevalcev (heterozigotnost od 0–50 %) imamo en sam lokus, in sicer pri oplemenjeni jezersko-solčavski lokus MAF214 z deležem heterozigotnosti 0,32 – pri tej pasmi smo na tem lokusu zasledili le 3 alele, kar je najmanjše število alelov na vseh lokusih.

4 RAZPRAVA IN SKLEPI

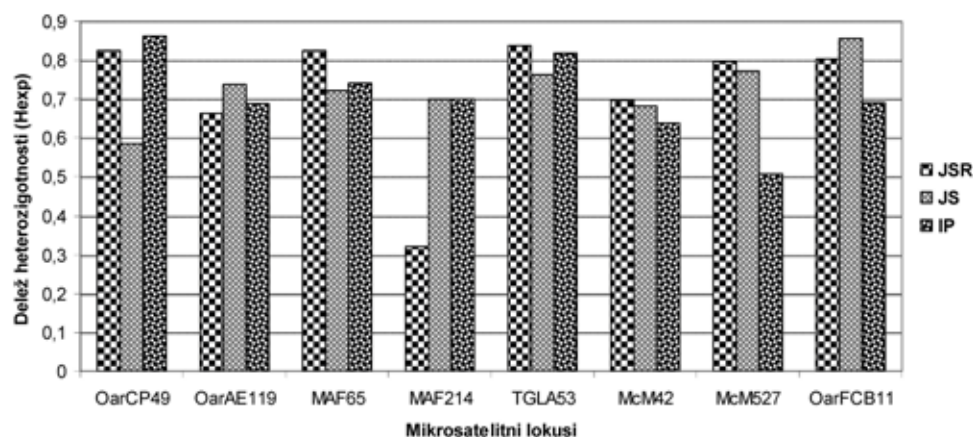
4.1 ANALIZA RODOVNIKOV

Pri preverjanju rodovniških podatkov smo z analizo genotipov ugotovili, da prihaja pri vodenju rodovniških podatkov drobnice do napak. V štirih družinah od 44-



Slika 4: Število alelov za posamezne mikrosatelitne lokuse pri jezersko-solčavski (JS), oplemenjeni jezersko-solčavski (JSR) in istrski pramenki (IP).

Figure 4: Number of alleles for genetic markers in Jezerko-Solčava (JS), Improved Jezerko-Solčava (JSR) and Bela krajina pramenka (IP) breeds.



Slika 5: Povprečna heterozigotnost na lokusih pri jezersko-solčavski (JS), oplemenjeni JS (JSR) in istrski pramenki (IP).

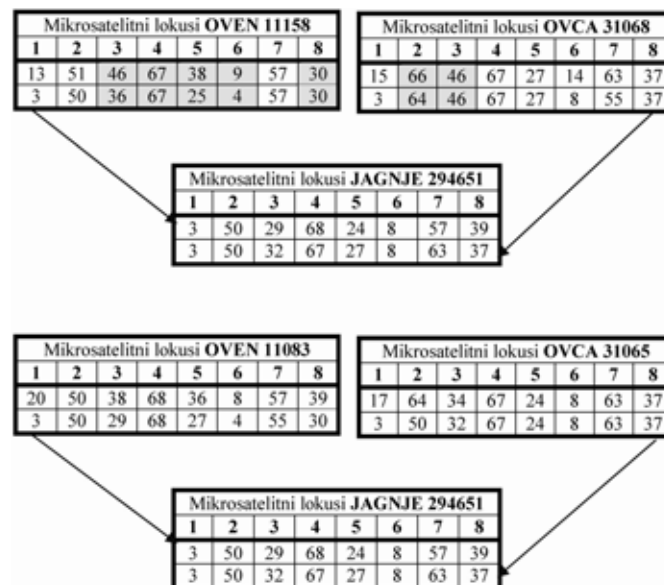
Figure 5: Average heterozygosity for analysed markers in Jezerko-Solčava (JS), Improved Jezerko-Solčava (JSR) and Bela Krajina pramenka (IP) breeds.

ih (9,1 %) smo zasledili neskladja v rodovnikih pri štirih od skupno sedmih rejcev, vključenih v analizo. V dveh primerih (rejec 1 in 3) sta bila potomcu napačno pripisana oba starša. Pri primeru rejca 1 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, ki so mu bili ob rojstvu pripisani (slika 6). 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, pravih staršev nismo mogli določiti.

Razlogov, zaradi katerih prihaja pri vodenju rodovnika do napak, je lahko več. Po podatkih selekcijske službe za leto 2006 je 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 oplemenjene jezersko-solčavske pasme s 3.690 registriranimi ovcami s 4.762 jagnjivami. Največ jagnjitev je bilo zabeleženih v spomladanskem obdobju z vrhoma v mesecu marcu in maju, z okrog 2500 rojenimi jagnjeti na mesec (Kompan s sod., 2006; Zajc in Komprij, 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). Lahko sklepamo, da se

taki primeri največkrat dogajajo pri jagnjitvah na pašniku ali v neprimerno urejenih hlevih, kjer je nadzorovanje poteka jagnjitev omejeno. Za naša dva primera bi lahko predpostavili, da je šlo za samo napako pri zapisovanju rojstnih podatkov, ali pa 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 in ga je posvojila druga ovca. 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 2), ki je jagnjetu (294664) pripisal napačno mater (52848). Četrty primer neskladja genotipov smo ugotovili pri rejcu 5, ki ima v tropu stalno prisotnega ovna in ga zaradi preprečevanja parjenja v sorodstvu vsakih nekaj paritvenih obdobj menjuje. Problem se pojavi ravno v času menjave enega plemenskega ovna z drugim, ko sta v tropu prisotna oba ovna.

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



Slika 6: Določanje pravih staršev (oven 11083 in ovca 31065) za potomca 294651, ki je bil v rodovniku pripisan napačni družini (ovnu 11158 in ovci 31068).

Figure 6: Identification of correct parents (sire 11083 and dam 31065) for the progeny 294651 that was assigned to a wrong family (sire 11158 and dam 31068).

številke in napačni pripis laboratorijske številke posameznemu vzorcu. Čeprav možnosti napak pri vzorčenju in obdelavi vzorcev v laboratoriju ne moremo povsem izključiti, menimo, da je večina neskladij (9,1 %) posledica napak pri vpisovanju in vodenju rodovnikov.

Zaključimo lahko z ugotovitvijo, da je natančnost rodovniških podatkov s strani rejcev in ob pomoči selekcijskih služb 90,9 %. Iz zgornje razprave sledi, 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 opisana v tej študiji, ki bi omogočala, da bi odstotek točnosti rodovnikov približali 100 % in s tem dosegli vodenje rodovnikov brez napak.

4.2 DOLOČANJE OČETOVSTVA

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 možnost določanja očetovstva in 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 v tej študiji preverjali, če je možno z izbranih setom osmih mikrosatelitov in uporabo programa ATLAS jagnjetom istrske pramenke določiti enega od možnih dvajsetih očetov. Z izbranimi osmimi mikrosateliti smo lahko trem jagnjetom istrske pramenke nedvoumno določili očeta izmed potencialnih dvajsetih ovnov. V primeru enega jagnjeta smo lahko izločili 18 potencialnih očetov, dva očeta sta bila enako verjetna. Zato smo analizo razširili in vanjo vključili dodatne štiri mikrosatelitne označevalce ter s tem uspešno določili očetovstvo tudi temu potomcu.

4.3 INFORMATIVNOST

Najvišji nivo heterozigotnosti in s tem informativnosti lokusa smo pri vseh treh pasmah dosegli z označevalcem TGLA53, 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. Rezultati deležev heterozigotnosti in števila alelov kažejo, da je najverjetneje stopnja inbridinga populacije istrske pramenke iz CSR Vremščice podobna kot pri jezersko-solčavski in oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi. To ugotovitev

utemeljemo z rezultatom, da smo pri tej pasmi dobili v povprečju 7,6 alelov na lokus, kar je sploh največ od vseh pasem, vključenih v raziskavo, heterozigotnost alelov pa je znašala 71 %. 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 inbridingiranosti populacije istrske pramenke morali analizirati večje število živali. Vendarle smo v enem od štirih družin odkrili višjo stopnjo sorodstva, kar lahko kaže, da znotraj pasme istrske pramenke lahko obstajajo visoko inbridirane pod-populacije 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. Za nadaljnje analize predlagamo, da se našemu uporabljenemu setu doda še označevalec Oar109 ali zamenja označevalec MAF512, ki je s petimi aleli in 51 % heterozigotnostjo na zelo nizkem informativnem nivoju.

Mikrosateliti, uporabljeni v tej študiji in analiza s programom ATLAS sta torej primerna pri preverjanju pravilnosti rodovniških podatkov in pri določanju očetovstva. 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. 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.). Tudi pri drobnici se srečujemo s čedalje strožjim selekcijskim nadzorom, zato so analize te vrste preizkušene, v nekaterih primerih pa tudi uporabljene. Ker pa je vse več populacij ovc, vključenih v programe obveznega genotipiranja za prionski gen, bi bilo zaželeno dodatno preverjanje porekla. To je pomembno tako z vidika ocenjevanja plemenske vrednosti jagnjeta kot z vidika kontrole inbridinga, torej izogibanja nadaljnega parjenja v sorodstvu, ter z vidika zanesljivejše genotipizacije za lokus PRNP.

Ta študija je pokazala, da kljub skrbi za natančno vodenje rodovniških knjig pri teh še vedno prihaja do napak. Da bi se napakam izognili, 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. Zaključimo lahko z dejstvom, da uporaba visoko polimorfni DNA označevalcev omogoča učinkovito in objektivno preverjanje rodovniških po-

datkov, predvsem pomemben pa je podatek, da postajajo ta orodja vse pomembnejša pri projektih ohranjanja genetske raznovrstnosti.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se rejcem in Centru za sonaravno rekultiviranje Vremščica za omogočanje raziskave z dovoljenjem za vzorčenje tropov. Domnu Drašlerju smo hvaležni za pomoč pri zbiranju vzorcev, Dušanu Birtiču za koristne nasvete ter dr. Andreju Razpetu za strokovno pomoč pri genotipiziranju.

6 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
- Belkhir K., Borsa P., Goudet J., Chikhi L., Bonhomme F. 1998. GENETIX. Logical sous Windows TM pour la genetiqe 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 DNA 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
- 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
- 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, Suplement 80: 192–201
- 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/Registrar2005/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)
- 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)
- Zajc P., Komprej A. 2007. Plodnost ovc in koz v kontroliranih tropih v Sloveniji za obdobje 2006. *Drobnica*, 12, 2: 7–9