

Genetisk karakteristik af Jysk kvæg



Jysk kvæg tyre (Anna Brüniche-Olsen)

Rapporten er udarbejdet af

Anna Brüniche-Olsen, specialestuderende

Peter Gravlund, amanuensis

Eline D. Lorenzen, postdoc

Biologisk Institut

Københavns Universitet

Indholdsfortegnelse

- Finansiering & udførelse	- 3 -
- Indledning & problemstilling	- 3 -
- Baggrund	- 4 -
- Teoretisk metodebaggrund	- 6 -
- Materialer & laboratoriemetoder	- 8 -
- Statistiske analyser	- 11 -
- Resultater	- 13 -
- Diskussion	- 23 -
- Konklusion	- 26 -
- Taksigelser	- 27 -
- Referencer	- 28 -
- Appendiks	- 31 -

Finansiering & udførelse

Undersøgelsen er bestilt af Genressourceudvalget under Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri. Den udførtes af specialestuderende Anna Brüniche-Olsen i samarbejde med hovedvejleder Peter Gravlund og medvejleder Eline Deirdre Lorenzen på Biologisk Institut under Københavns Universitet med finansiel støtte fra Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri.

Indledning & problemstilling

Indledning

I Danmark er der, ligesom i resten af Europa, stor interesse for bevaring af de oprindelige kvægracer både for at sikre, at den biologiske mangfoldighed, den kulturhistoriske arv samt det karakteristiske kulturlandskab ikke går tabt, men kan videregives til kommende generationer. En af de oprindelige danske kvægracer er Jysk kvæg. Der har gennem længere tid hersket uklarhed mellem avlere af denne race, om hvilke besætninger der var de mest oprindelige og om der var sket krydsning mellem besætningerne. Derfor besluttede Genressource Udvalget i 2006 at undersøge uenigheden ved at få kortlagt den genetiske diversitet og populationsstrukturen, i den efterhånden meget begrænsede population af Jysk kvæg. Projektet blev udlagt som speciale på Københavns Universitet. Genotypningen skulle inkludere tre markørsystemer henholdsvis sekventering af den mitokondrielle d-loop region (mtDNA), mikrosatellitter og Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).

I genotypning undersøgelser benyttes normalt kun mikrosatellitter eller mtDNA, men da projektet skulle udgøre en speciale afhandling valgte man, at undersøge hele tre markørsystemer. Dette giver det komplette billede af den genetiske sammensætning hos det nulevende Jyske kvæg.

I 2007 påbegyndtes arbejdet med at finde frem til repræsentative individer. Under udvælgelsesprocessen blev der lagt vægt på, at få så mange individer fra de tre påståede stam-besætninger med som muligt, samt at undersøge den genetiske diversitet, der ligger uden for disse. Det var muligt at genotype omkring 180 dyr i undersøgelsen, hvilket er omkring 40-50% af de nulevende dyr. Hovedparten af blod- og vævsprøverne forefandtes på Forskningscenter Foulum under Aarhus Universitet, de resterende blodprøver blev udtaget d.20 december 2007 fra Stig Benzons besætning.

Problemstilling

Følgende hovedspørgsmål ønskes besvaret i analysen: Består Jysk kvæg af én eller flere genetisk adskilte grupper?

Den genetiske karakteristik af Jysk kvæg skal danne grundlag for den fremtidige avlsstrategi indenfor racen og på baggrund af denne undersøgelse, skal det besluttet hvorvidt avlen skal være samlet eller holdes adskilt (Ref.2 & 11).

Baggrund

Moderne kvæg

I dag er størstedelen af det mælk- og kødproducerende kvæg der findes i verden af europæisk oprindelse. Dette skyldes den store adaptive selektion der har foregået de sidste mange århundrede. Det moderne landbrug har fremavlet kvæg med stor kødsætning, høj mælkeproduktion, fedtrig mælk osv. Denne selektion har ført til, at de enkelte kvægracer er blevet genetisk mere homogene, hvilket har givet anledning til indavl indenfor racerne. Indavlen har bevirket, at de enkelte racer er blevet mere ensartede samt at den effektive populationsstørrelse er faldet, hvilket har forårsaget tab af genetisk variation. Indavlen truer produktiviteten i kvægbruget f.eks. ved fald i produktivitet, fertilitet og overlevelse. Det er derfor af yderste vigtighed, at bevare den genetiske diversitet hos kvægracerne, således at der også i fremtiden vil være en bred vifte af genressourcer tilgængelige. Diversiteten bevares ved at holde lokale racer adskilt, således at der ikke sker blanding mellem dem. Det er derfor vigtigt at få bestemt den genetiske sammensætning af de forskellige lokale racer, således at en velfunderet avlsstrategi kan udarbejdes (ref. 2, European Cattle Genetic Diversity Consortium 2006, Christiansen 2007, Frankham et. al. 2002).

Jysk kvæg

Det Jyske kvæg stammer fra det oprindelige sort- og gråbrogede kvæg, som var udbredt i Jylland fra 1600 til 1800-tallet. Oprindeligt var der tale om en lavbenet race af små, knoklede dyr med høj halerod. I 1881 blev den første stambog for Jysk kvæg udgivet og man begyndte systematisk at avle for at forbedre racen. Kvæget blev i starten enten holdt som kød- eller malkekqvæg, hvor malketypen gennemgående var mindre end kødtypen. Gennemsnitshøjden for køer var omkring 120 cm og de vejede ca. 350 kg. I første halvdel af 1900-tallet udvikledes racen til en egentlig malke race, og man begyndte at krydse den med Sortbroget Hollandsk kvæg, hvilket resulterede i,

at dyrene blev mere regelmæssige i deres bygning, større og væsentlig mere højbenede og fænotypisk kom til at minde mere om det hollandske kvæg. Dette gav ophav til en ny type, som man kaldte Sortbroget Dansk Malkekvæg (SDM). Den nye race gav mere mælk og kød end det Jyske kvæg, og gennemsnitsvægten for køer steg til ca. 525 kg. Den blev hurtigt mere populær end det Jyske kvæg, der næsten forsvandt som selvstændig race. I 1955 eksisterede det Jyske kvæg officielt ikke mere. I 1987 gik Genressourceudvalget ind i arbejdet for at bevare det Jyske kvæg, og i et samarbejde med frilandsmuseer og private avlere har man reddet racen. Racen er i dag på listen over bevaringsværdige danske husdyrracer. Der har i en årrække været en hel del kontroverser avlerne imellem om hvor mange grupper Jysk kvæg bestod af samt hvilke der var de mest oprindelige. Jysk kvæg formodes at bestå af de følgende tre grupper:

1. *Gammeldags Jysk malkekvæg*

Denne gruppe holdes på Oregaard og hos Leo Kortegaard. Her menes ikke at være krydset med hverken Hollandsk kvæg eller SDM, men udelukkende at være tale om en ren Jysk kvæg gruppe

2. *Westergaard gruppen*

Dette er en gammel familiebesætning, hvor der ikke menes at være sket krydsning med andre racer, men dog er forekommet en vis grad af modernisering ved avl og selektion.

3. *Rekonstrueret Jysk kvæg*

Denne gruppe er avleren Karl Nielsens (Vesterbølle) forsøg på at rekonstruere det Jyske kvæg. Fænotypisk minder dyrene om det Hollandske kvæg og er mere kødkvægspregt end de ovennævnte typer, desuden hersker der tvivl om hvorvidt der er introduceret gener fra Charolais kvæget i bestanden.

(Ref. 1, 7, 8, 9, 11)

Teoretisk metodebaggrund

MtDNA

Mitokondrier har, i modsætning til de resterende kromosomer, et cirkulært genom. Replikation af mitokondriegenomet sker fra displacement-loop (d-loop) start-sitet. D-loop DNA-sekvensen fungerer som kontrolregion og koder ikke for nogen gener. Der er højere mutationsrate samt lavt selektionstryk i denne region, sammenlignet med resten af mitokondriegenomet, hvilket bevirker at et stort antal substitutioner akkumuleres på relativt kort tid. Den høje mutationsrate og det lave selektionstryk gør d-loop sekvensen ideel til undersøgelse af variation indenfor tæt beslægtede arter eller indenfor populationer, da der vil udvises høj grad af polymorfi over en relativt kort tidsperiode.

Da mitokondrielt DNA nedarves maternalt, giver D-loop sekvenserne kun information om den maternale stamtavle og dermed maternale haplotype. Diversiteten af haplotyperne kan bruges som estimat for den genetiske variation af arten eller populationen samt til rekonstruktion af individets evolutionære historie gennem en fylogenetisk analyse, hvorved slægtskabsforholdene imellem DNA sekvensen af de enkelte individer estimeres.

D-loop regionen amplificeres ved PCR hvor der bruges af primere der binder til de flankerende sekvenser. PCR-produkterne oprenses og sekventeres. Haplotyper bestemmes ud fra sammenligning med en konsensus sekvens. PCR-produkterne køres på en denaturerende polyakrylamid gel, der separerer fragmenterne, således at haplotyperne for de forskellige individer kan bestemmes. Yderligere kan fragmenterne sekventeres og polymorfe sites identificeres (ref. 4, 6, Weaver 2007, Frankham et. al. 2002).

Mikrosatellitter

Mikrosatellit DNA loci er korte segmenter (2-6 bp) af DNA der er gentaget flere gange i træk (repeats). Det antages at de følger "slippage" modellen for duplikering eller deletion, og derved kan antallet af repeats ændres under meiosen. Der er stor grad af polymorfi i antallet af repeats mellem og endda indenfor arter, og mikrosatellitter er derfor ofte brugt som markører for genetisk mapping og genetisk linkage. De kan bruges til at estimere den gennemsnitlige gendiversitet i populationer, da det antages at de følger en stepvis mutation model (Kimura & Otha 1978), hvor alleler er repræsenteret ved at antallet af nukleotid repeats og antallet af substitutioner

antages at stige eller falde som følge af allel størrelse. Den gennemsnitlige heterozygositet kan estimeres og bruges som mål for den genetiske variation i populationen.

For at undersøge størrelsen af mikrosatellitter kan man ved PCR amplificere mikrosatellit sekvensen. Alt efter antallet af repeats vil PCR-produkterne have forskellig længde, der efter farvning kan visualiseres ved elektroforese. Primere designes således at de hybridiserer til de flankerende regioner af det pågældende mikrosatellit locus.

Da et individ både arver et maternalt og et paternalt kromosom kan PCR-undersøgelsen afdække om det pågældende individ er homozygot eller heterozygot for en given mikrosatellit haplotype. Der vil i de fleste tilfælde være forskel i den genotypiske fordeling af mikrosatellitter hos individer jo længere den genetiske afstand imellem dem er, derfor kan et overtal af homozygoter (Wahlund effekt) fra Hardy-Weinberg være tegn på indavl i populationen.

Der kan med fordel undersøges flere mikrosatellitter for hvert individ, således at estimatet af artens diversitet bliver mest præcis. Generelt undersøges omkring 30 mikrosatellit markør loci når der laves genetiske populationsstudier på kvæg (CadBase) (ref. 5, Frankham et. al. 2002, Nei & Kumar 2000, Weaver 2007).

AFLP

AFLP er en genetisk "fingerprinting" teknik. Den er yderst sensitiv og god til påvisning af polymorfi indenfor arter eller populationer. Da det er autosomale markør loci der undersøges, giver metoden information om både maternale og paternale haplotyper, og genotyperne for de biallele loci kan bestemmes for hvert individ.

Ved AFLP skæres DNA'et først med et eller flere restriktionsenzymmer. Dette efterlader DNA restriktionsfragmenter med ender hvortil komplementære dobbeltstrengede adaptorer kan ligges på. Derefter laves PCR på fragmenterne hvor primerne er designet således at de hybridiserer til adaptor og restriktions-site fragmenterne. Derved amplificeres antallet af fragmenter og størrelsen af de pågældende fragmenter kan efterfølgende skilles ved elektroforese på denaturerende polyakrylamid gel og visualiseres ved autoradiografi eller fluorescence metoder.

Da restriktionsenzymmer genkender forskellige DNA-sekvenser, kan metoden med fordel bruges med flere restriktionsenzymmer samtidig. Dette bevirker at der kan opnås information om polymorfi i mange fragmenter (50-100) samtidig.

AFLP er mere sensitiv, lettere at reproducere samt har en høj opløsning i forhold til andre metoder (f.eks. RFLP, mikrosatellitter og RAPD) hvilket gør den yderst anvendelig i genetiske studier. Desuden er det ikke nødvendigt at have nogen information om den sekvens der ønskes undersøgt (ref. 3, Blears et. al. 1998, Frankham et. al. 2002, Vos et. al. 1995, Weaver 2007).

Materialer & laboratoriemetoder

Prøver

Der blev rekvireret blod-, vævs- og DNA-prøver fra Foulum, Århus Universitet fra i alt 140 dyr. Derudover udtogs der blodprøver fra 33 dyr fra besætningen tilhørende Gorm og Stig Benzons, Oregaard (CHR nr.81335). Prøverne stammede fra fire store besætninger samt en bred vifte af mindre besætninger. Fra de fire største besætninger udvalgte henholdsvis; 21 dyr fra Leo Kortegaards besætning (CHR. nr. 32360 og 77142), fra Vesterbølle besætningen udvalgte 36 dyr (CHR. nr. 33382, 41754, 64583, 65908, 67375, 74257 og 81788), Christian Westergaard dyrene udgjorde 28 individer (CHR. nr. 66795 og 78750) og fra Gorm og Stig Benzons, Oregaard besætning (CHR. nr. 81335) udvalgte 49 dyr, derudover inkluderedes data fra 48 dyr tilhørende denne besætning. Sidstnævnte data stammede fra en tidligere undersøgelse af Agersø kvæget lavet af Kim Bidstrup Withen ved Biologisk Institut, Københavns Universitet i 2005. Prøverne fra de mindre besætninger udgjorde tilsammen en gruppe på 54 individer. De var udvalgt således at de, ud fra informationen på CHR-registerets hjemmeside, havde mindst muligt slægtskab (ref. 10).

DNA ekstraktion

DNA blev ekstraheret og oprenset fra blod- og vævsprøver ved hjælp af *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) som fabrikationsprotokollen foreskrev og derefter opbevaret ved -20°C. Opbevaringsbuffer (AE) indeholdt: 10 mM tris-Cl, 0,5 mM EDTA og havde pH=9,0.

MtDNA

Den mitokondrielle kontrolregion (d-loop) amplificeredes i en PCR ved brug af to flankerende primere 5'-CTG CAG TCT CAC CAT CAA CC-3' og 5'-AGA

GTT AAC AGG AAG GCT GG-3'. Der amplificeredes i 25µl volumen PCR, som indeholdt 2,5µl PCR-buffer, 2,5µl 10µM af hver primer, 6,5µl dobbelt destilleret vand, 10µl GATC, 0,2 µl *Taq* polymerase and 1 µl oprenset DNA. DNA denatureredes i 2 min. ved 94°C, efterfølgende kørt 35 cykler med 1 min. denaturering ved 94°C; 1 min. annealing ved 57°C og 1 min. ekstension ved 72°C. Fulgt af en slut ekstension af 10 min. varighed ved 72°C. PCR produkterne kørt på en 2% agarosegel og visualiseredes efterfølgende under UV-lys.

Oprensning af PCR-produkter

Oprensning af PCR-produkter fulgte *Invisorb Vacuummanifold* protokolen. De oprensede produkter og 300µl bindingsbuffer overførtes til en 96 brønd DNA-binding plade der placeres på en bufferopsamlingsplade i vacuumsug. Der inkuberedes i 1 min. hvorefter pladen dækkes med et tætsluttende plastfolie og stilles i vacuum i 20 min. Efterfølgende udskiftes bufferopsamlingspladen med en mikrotiterplade. Der tilsættes 60µl elutionbuffer til hver brønd og inkuberes i 5 min. efterfulgt af 5 min. ved vacuum. De oprensede PCR-produkter opbevares i fryser indtil videre brug.

Cyklisk sekventering

Sekventering udførtes ved hjælp af et *ABI-Prism® BigDye terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* hvor fabrikantens protokol fulgtes. Følgende to primerpar blev brugt i sekventeringen; 5'-CTG CAG TCT CAC CAT CAA CC-3' (Loftus et. al.1994) og 5'-CGA GAT GTC TTA TTT AAG AGG-3' (Cymbron et. al. 1999) samt 5'-CGC TCC GGG CCC ATA AAC CG-3' (Withen et. al. unpublished) og 5'-GCC TGC GTT TAT ATA TTG AC-3' (Withen et. al. unpublished). Det første fragment udgjorde en sekvens på 597bp og det andet fragment en sekvens på 588bp. De to fragmenter overlappede og kunne efter sekventeringen sættes sammen til en komplet sekvens. For hver primer (seq1F, seq1R, seq2F og seq2R) kørt der en PCR i 10 µl volumen med 2µl BigDye readymix, 1µl BigDye buffer, 2,8µl ddH₂O, 1,2µl primer og 3µl oprenset PCR-produkt. Der kørt 30 cykler med denaturering ved 96°C i 10 sek.; annealing ved 50°C i 5 sek. og ekstension ved 60°C i 4 min.

Sekvensreaktionerne fældedes i plader med et miks af 1µl 125mM EDTA, 1µl 3M NaOAc og 25µl 96% iskold ethanol. Der tilsættes 27µl miks til hver prøve.

Prøverne sættes på is i 5 min, hvorefter de blev centrifugeret i 45 min. ved 2250xg. Pladerne vendtes på hoved på køkkenrulle og centrifugeredes i 30 sek. ved 150xg. Der tilsattes 125µl iskold 70% ethanol til hver prøve, hvorefter de blev centrifugeret ved 1650xg i 15 min. Pladen vendtes igen på hoved på køkkenrulle og centrifugeredes yderligere i 30 sek. ved 150xg. Pladen blev tørret i mørke ved 65°C og opbevaret ved -20°C indtil sekventering.

Sekventering af mtDNA

Sekventeringen udførtes på en *ABI-Prism® BigDye terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* i et volumen på 20µl volumen som foreskrevet af fabrikanten. Resultaterne blev analyseret i programmet *Sequencher™* (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) og de komplementære strenge fra hvert af de to fragmenter blev inspiceret for fejl og sat fusioneret til en enkelt sekvens for hvert individ.

Mikrosatellitter

30 mikrosatellit loci blev genotypet for hvert individ. ISGA/FAO anbefaler at netop disse loci benyttes som standard til genotypning af kvæg. Genotypningen udførtes ved hjælp af to kommercielle kits. Det ene; *StockMarks® Horse and Cattle Paternity PCR Typing Kits (Applied Biosystems)* inkluderede 11 af markørerne; TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 og BM1824. PCR blev udført som foreskrevet i protokollen og alle markører blev amplificeret i én PCR reaktion. De resterende 19 mikrosatellitter; INRA063, INRA005, ILST005, HEL5, HEL1, INRA035, ETH152, HEL9, CSM66, INRA032, HEL13, INRA037, BM1818, ILST006, MM12, CSRM60, ETH185, HAUT24 og HAUT27, blev genotypet i *QIAGEN® Multiplex PCR Kit* også her fulgtes anvisningerne i fabrikantens protokol. PCR-reaktions betingelserne for de fire multiplex systemer er anført i appendiks 1.

PCR-produkterne kombineredes, som anført i appendiks 1, for de fire systemer og blev analyseret på *ABI-Prism® BigDye terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit*. Efterfølgende blev allelfragmenternes størrelse bestemt og scoret for hvert individ i *Genemapper®*. Her blev data korrigeret efter to individer fra Oregaard besætningen, der tidligere havde været med i en tidligere karakteristik af Agersø

kvæget og derfor var korrigeret efter de internationale standarder. Det drejede sig om dyrene med CHR. nr. 81335-00453 og 81335-00424.

AFLP

AFLP metoden blev opsat på afdelingen for Fossilt DNA & Evolution, Københavns Universitet, men da vi efter gentagne forsøg desværre ikke var i stand til at generere nogle data, så vi os grundet tidspres nødsaget til at få metoden lavet kommercielt. Vi sendte oprenset DNA til *Keygene Genetics*, Wageningen (Holland) som lavede laboratorium arbejdet samt scorede de individuelle fragmenter for os.

Til skæring af genomet brugtes *EcoRI* og *TaqI* restriktionsenzymene, derefter amplificeredes fragmenterne med følgende tre primer kombinationer: E35/T32, E39/T33 og E45/T32 (Ajmone-Marsan et. al. 1997). E35/T32 (E35: 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAC A-3' og T32: 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAA C-3') E39/T33 (E39: 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAG A-3' og T33: 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAA G-3') samt E45/T32 (E45: 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAT G-3' og T32: 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAA C-3').

Keygene genotyped i alt 178 individer hvoraf 14 stammede fra et tidligere studie af Kim B. Withen. Grundet at der for enkelte prøver ikke var mere DNA tilbage, var det desværre ikke alle dyr vi kunne AFLP genotype. Data fra dette studie samt det førnævnte skulle konvergeres, men da scoringen af genotyperne trak ud var dette ikke muligt.

Statistiske metoder

I det følgende svarer benævnelsen ”de fire besætninger” til Kortegaard, Vesterbølle, Westergaard og Oregaard besætningerne. ”Den samlede population” svarer til alle individerne hvilket inkluderer de fire besætninger samt de individer der ikke hører under nogle af disse.

MtDNA kontrol region analyse

Fragmenterne for de enkelte dyr blev samlet og redigeret i programmet *Sequencer version 4.8* (Gene Code cooperation) og for hvert dyr blev der konstrueret en konsensus sekvens. Sekvenserne blev alignet og formateret i *ClustalX version 2.0.7* (Larkin et. al. 2007). Kvantificering af den genetiske variation i de enkelte besætninger og i den samlede populations blev bestemt i *MEGA4* (Tamura et. al. 2007)

og *DnaSp* (Rozas & Rozas 1995) som haplotype og nukleotid diversitet i følge Nei (1987).

Programmet *Modeltest* (Posada & Crandall 1998) anvendes til at finde den substitutionsmodel der beskrev data bedst baseret på Akaike Information Criterion (AIC) (Akaike 1974).

Populationsstrukturen de fire besætninger imellem samt for den samlede population blev analyseret i *Arlequin version 3.11* (Excoffier et. al. 2005). Intra-populations analyser blev udført for de fire besætninger og den samlede population. Grundet at *Arlequin* ikke har HKY+G substitutionsmodellen tilgængelig, anvendtes Tamura-Nei modellen (1993) i stedet, da HKY modellen er implementeret i denne, dog med en lille forskel at transitionelle substitutioner har forskellige rater. AMOVA (Weir & Cockerham 1984) analyser af populationsstruktur, Tajima's D , F -statistik (populationsspecifik Φ_{ST} , parvise Φ_{ST} , parvise forskelle mellem Φ_{ST}) og eksakt test for differentiering af populationerne. Parvise signifikante forskelle blev korrigeret ved Sekventiel Bonferroni Korrektion følgende Holms metode (Holm 1979).

Hudsons homogenitets tests for henholdsvis haplotype (H_{ST}) og sekvens (K_{ST}) udførtes i *PopStr version 1.25* (Siegismund unpublished).

Mikrosatellit analyse

Alle loci blev tjekket for mulig allel stuttering, allel drop out og nul alleler i *Mikro-Checker* (Oosterhout et. al. 2004). Overskud af homozygoter sammenlignet med Hardy-Weinberg forventninger og afvigelser fra linkage equilibrium blev estimeret i *Genepop version 3.4* (Raymond & Rousset 1995) ved 10^5 gentagelser. Fishers eksakte test anvendtes til at teste for signifikante afvigelser. Loci der afveg signifikant fra de nævnte kriterier ekskluderedes fra videre analyser.

Basis diversitets indicier for det gennemsnitlige antal af observerede og forventede alleler, private alleler, observerede og unbiased forventet heterozygositet samt fixation indexes estimeredes i *GeneAlex* (Peakell & Smouse 2006).

Til beregning af antallet af populationer i vores sample anvendes *Structurama* (Huelsenbeck 2008). Programmet estimerer antallet af populationer baseret på prior og posterior sandsynligheder. To separate MCMC runs blev udført i *Structurama*. I det ene inkluderedes alle individer og i det efterfølgende var det kun individer fra de fire besætninger (Kortegaard, Vesterbølle, Westergaard og Oregaard). I begge runs blev antallet af populationer angivet til et være en tilfældig variabel, og programmet

estimerer dermed det mest sandsynlige antal populationer ud fra en Dirichlet proces prior (Pella & Masuda 2006).

Structure version 2.2 (Pritchard 2000) blev brugt til at analysere subpopulations strukturen hos det Jyske kvæg. Programmet er baseret på en bayesiansk algoritme og grupperer individer i populationer ved at forsøge at maksimere Hardy-Weinberg ligevægten i de enkelte grupper. Programmet angiver for hvert individ dets relative tilhørsforhold i de enkelte grupper på baggrund af genotypen. En ad hoc delta K metode (Evanno 2005) blev brugt til at estimere det mest sandsynlige antal populationer.

AFLP analyse

Den genetiske diversitet blev bestemt i *GeneAlex* som antallet af observerede alleler, det forventede antal alleler, den observerede heterozygositet samt den forventede heterozygositet. En AMOVA test i *GeneAlex* estimerede hvor stor en andel af den genetiske variation der lå henholdsvis mellem og i populationerne, der udførtes 9999 permutationer som test for signifikant forskel mellem populationerne på 0.05 niveauet. Graden af populations differentiering blev beskrevet ved parvise F_{ST} test i *GeneAlex* og testet for signifikante forskelle med sekvential Bonferroni korrektion. En Principal Component Analysis (PCA) udførtes til at visualisere variationen mellem individerne. Den beskriver variationen som koordinatsæt udfra Eigenverdier og eventuelle grupperinger af individer vil kunne ses i koordinatsystemet.

Resultater

Genetisk diversitet

MtDNA diversitet

I den samlede population af Jysk kvæg fandtes 19 haplotyper (se appendiks 2). Der var to haplotyper, henholdsvis H5 (96 individer) og H6 (67 individer), der tilsammen udgjorde ca. 75% af de observerede haplotyper. Kortegaard populationen havde otte haplotyper hvoraf to var unikke for populationen. Vesterbølle havde også otte haplotyper hvoraf tre var unikke. De to haplotyper hos Westergaard blev også fundet i andre populationer. Oregaard havde fire haplotyper hvoraf to var unikke for denne population. I den blandede gruppe af individer, der ikke hørte under nogle af de førnævnte populationer, blev fundet tolv haplotyper hvoraf tre var unikke.

Haplotype diversiteten, h , varierede fra 20.5% hos Westergaard til 81.0% hos Kortegaard, med en variation for den samlede population på 72.6% (tabel 1). Nukleotid

diversiteten, π , varierede fra 0.084% hos Westergaard til 0.465% hos Vesterbølle med en diversitet på 0.360% hos den samlede population (tabel 1).

Tajima's D blev beregnet for at tjekke for selektion i d-loop regionen. D værdierne ikke signifikante (tabel 1).

Tabel 1. Genetisk haplotype (h) og nukleotid (π) diversitet i mtDNA'et for de fire populationer og den samlede population samt test for selektion (Tajima's D). Baseret på 737 basepar.

Population	n	Hapl typer	Haplotype diversitet, h (%) (stdev)	Nukleotid diversitet, π (%) (stdev)	Tajima's D
Kortegaard	21	8	81,0 (0,42)	0,378 (0,071)	-1.38 ^{ns}
Vesterbølle	34	8	73,6 (5,10)	0,465 (0,052)	-0.59 ^{ns}
Westergaard	27	2	20,5 (9,5)	0,084 (0,039)	-0.51 ^{ns}
Oregaard	81	4	32,3 (6,3)	0,143 (0,029)	-0.62 ^{ns}
Total	217	19	72,6 (2,3)	0,360 (0,019)	-0.85 ^{ns}

(ns; $P > 0.05$).

Mikrosatellit diversitet

Den genetiske diversitet for mikrosatellitterne blev undersøgt for de fire populationer samt for den samlede population (tabel 2). Der blev fundet 152 alleler fordelt over 23 loci. Det gennemsnitlige antal observerede alleler var stort set ens for de fire populationer og lå noget højere for den samlede population, hvilket ikke er overraskende når ophavet og størrelsen tages i betragtning. Der blev fundet én unik allel hos både Kortegaard og Vesterbølle, 5 unikke alleler hos Westergaard og 6 hos Oregaard. Da den samlede population består af individerne fra alle fire populationer samt de individer der falder uden for disse, giver det ikke mening at tale om private alleler i denne gruppe.

Den observerede heterozygotitet lå mellem 0.560 og 0.656 for de fire populationer og 0.612 for den samlede population. Dette anses for værende over det moderate niveau (0.5).

Hos Kortegaard og Westergaard blev der ikke påvist signifikant afvigelse fra Hardy-Weinberg ligevægt (HWE), og der er derfor ikke evidens for indavl i disse to populationer. Vesterbølle og Oregaard populationerne afveg signifikant fra HWE, hvilket indikerer indavl og introduktion af nye alleler respektivt. Den samlede population afviger signifikant fra HWE, og der er evidens for, at der er blevet introduceret nye alleler.

Der blev for alle populationer observeret signifikante afvigelser fra linkage equilibrium. Dette kan skyldes flow af gener mellem to populationer eller at loci sidder tæt sammen på et kromosom, og derfor bliver overført sammen. Sidstnævnte kan afvises, da markør loci er udvalgt således, at de ligger langt fra hinanden, f.eks. på separate kromosomer, og derfor ikke er koblete.

Tabel 2. Genetisk diversitet angivet for hver besætning som observeret allelfrekvens (A_O), private alleler (A_P), observeret heterozygositet (H_O), unbiased forventet heterozygositet (U_{H_E}), indavlskoefficient (F_{IS}), afvigelse fra Hardy-Weinberg (HWE) og afvigelse fra linkage equilibrium (LE) for mikrosatellitdata for de fire populationer og den samlede population ud fra antallet af individer (n).

Population	n	A_O	A_P	H_O	U_{H_E}	F_{IS}	HWE	LE
Kortegaard	21	4.78	1	0.656	0.636	-0.064	ns	9**
Vesterbølle	36	4.74	1	0.560	0.539	-0.059	*	18**
Westergaard	28	4.96	5	0.617	0.607	-0.035	ns	9**
Oregaard	82	4.70	6	0.605	0.628	0.031	**	33**
Total	221	6.57	-	0.612	0.664	0.074	**	38**

ns (not significant), * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$).

AFLP diversitet

De tre sæt af markører gav henholdsvis 14 (E35/T32), 20 (E39/T33) og 24 (E45/T32) fragmenter svarende til 58 fragmenter totalt. Den genetiske diversitet for AFLP-data blev undersøgt for de fire populationer og den samlede population (tabel 3). Det gennemsnitlige antal observerede og forventede alleler er stort set ens for de fire populationer samt den samlede population. Det gennemsnitlige observerede antal alleler ligger omkring 1.85-1.95 og det forventede ligger lidt lavere på 1.51-1.55.

Den observerede heterozygositet for AFLP (tabel 3) ligger noget lavere end for mikrosatellit data (omkring 0.6) på 0.301-0.326, men da der for dominante markører højest kan opnås en heterozygositet på 0.5, må denne siges at ligge i den højere ende. Den observerede heterozygositet stemmer godt overens med den forventede.

Tabel 3. Genetisk diversitet angivet som antal observerede alleler (A_O) og observeret heterozygositet (H_O) samt unbiased forventet heterozygositet (U_{H_E}) for AFLP-data for de fire populationer og den samlede population ud fra antallet af individer (n)

	n	A_O	H_O	U_{H_E}
Kortegaard	18	1.85	0.317	0.335
Vesterbølle	34	1.95	0.325	0.335
Westergaard	28	1.95	0.326	0.338
Oregaard	45	1.93	0.301	0.308
Total	178	1.92	0.319	0.329

Analyse af genetisk varians

I de følgende analyser er kun anvendt data fra Kortegaard, Vesterbølle, Westergaard og Oregaard. Dette skyldes at en gruppering af de individer, som ikke hører under nogle af de nævnte populationer, vil være en kunstig gruppering og dermed upålidelig.

En AMOVA test for forskelle i genetisk varians for Kortegaard, Vesterbølle, Westergaard og Oregaard viste, at 34.8% af variationen i mtDNA'et lå mellem populationerne mens 65.2% lå indenfor populationerne (tabel 4). Det overordnede fixations indeks var $\Phi_{ST} = 0.348$, hvilket indikerer et underskud af heterozygoter i forhold til Hardy-Weinberg forventning. For mikrosatellitterne fandtes 12.1% af variationen mellem populationerne og 87.9% indenfor populationerne. Her lå det overordnede fixations index noget lavere, $\theta_{ST} = 0.121$, men der var stadig et underskud af heterozygoter sammenlignet med det der forventedes fra Hardy-Weinberg. AFLP-data (F_{ST}) viste at en lille del af den molekylære variation (2%) lå mellem populationerne og største parten (98%) indenfor populationerne.

Tabel 4. AMOVA test af den procentvise fordeling af genetisk variation for mtDNA(Φ_{ST}), mikrosatellitter (θ_{ST}) og AFLP (F_{ST}).

	mtDNA (Φ_{ST})	Mikrosatellitter (θ_{ST})	AFLP (F_{ST})
Mellem populationer	34.8%	12.1%	2%
Indenfor populationer	65.2%	87.9%	98%

I en "Exact test of sample differentiation" med sekventiel Bonferroni korrektion efter Holms metode (Holm 1978) blev der i mtDNA data fundet signifikant forskel ($P < 0.01$) mellem populationerne. For mikrosatellit data blev der ikke fundet

signifikant forskel mellem populationerne. Dette kan muligvis skyldes en udveksling af genetisk materiale gennem udveksling af tyre, men ikke udveksling af køer mellem de fire populationer.

Populations differentiering

De parvise Φ_{ST} og θ_{ST} værdier er listet i tabel 5. Der er testet for signifikant forskel mellem populationerne ved en "Exact test of sample differentiation", begge test er korrigerede for signifikante forskelle med sekventiel Bonferroni korrektion efter Holms metode (Holm 1978). De parvise sammenligninger viste alle signifikante forskelle ($P < 0.01$ eller $P < 0.05$) mellem de respektive populationer for begge markører. Overordnet fandtes signifikant forskel ($P < 0.01$) mellem populationerne på baggrund af haplotyperne, men ikke på baggrund af mikrosatellitterne ($P > 0.05$). Det skal bemærkes at Φ_{ST} og θ_{ST} kan være følsomme overfor forskelle i populations størrelse.

Tabel 5. Genetisk differentiering mellem populationerne baseret på parvise sammenligninger af mtDNA-data (Φ_{ST}) og mikrosatellitdata (θ_{ST}) værdier henholdsvis under og over diagonalen.

	Kortegaard	Vesterbølle	Westergaard	Oregaard
Kortegaard		0.160**	0.103**	0.079**
Vesterbølle	0.064*		0.137**	0.151**
Westergaard	0.361**	0.339**		0.096**
Oregaard	0.254**	0.284**	0.672**	

(* $P < 0.05$ og ** $P < 0.01$).

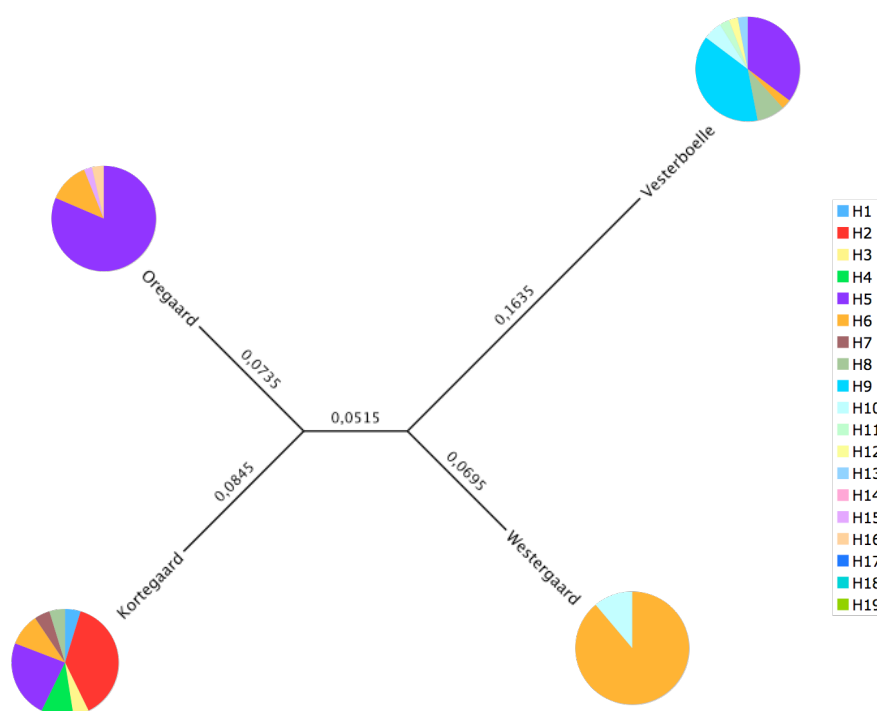
Nei's genetiske afstand (Nei 1972) og mål for hvor genetisk identiske populationerne er estimeredes parvist for de fire populationer på baggrund af mtDNA'et (table 6). Nei's standard genetiske afstand (D) er tilnærmelsesvis lineær over tid under forudsætning af at mutationsraten antages at være ens for alle alleler. Nei's genetiske identitets mål (I) rangerer fra 0 (ingen delte alleler) til 1 (identiske allel frekvenser). For begge mål er brugt den unbiased estimator, hvilket betyder at der er korrigeret for forskel i populations størrelse.

Table 6. Parvise sammenligninger af Nei's genetiske afstande (D) og genetiske identitet (I) for de fire besætninger på basis af mtDNA-data henholdsvis under og over diagonalen.

	Kortegaard	Vesterbølle	Westergaard	Oregaard
Kortegaard		0.734	0.812	0.854
Vesterbølle	0.297		0.792	0.747
Westergaard	0.208	0.233		0.825
Oregaard	0.158	0.291	0.192	

Figur 1 viser et unrooted neighbor-joining (NJ) træ på baggrund af de genetiske afstande D (table 6). Afstandene mellem besætningerne er angivet på grenene, og det ses, at afstanden mellem Kortegaard og Oregaard er mindst og at disse to populationer danner et separate clade. Afstanden mellem dette clade og Westergaard er mindre end mellem cladet og Vesterbølle, hvorfor den sidstnævnte splitter ud sidst. De individuelle haplotyfordelinger (appendiks 2) er angivet som cirkeldiagrammer. Det ses, at Westergaard og Oregaard primært består af en haplotype. Kortegaard og Vesterbølle besætningerne har en mere divers haplotypeprofil, og fordelingen af haplotyper er mere ensartet, dog med to haplotyper der forekommer oftes.

Figur 1. Neighbor-joining træ for de fire besætninger baseret på Nei's unbiased genetiske afstande D . Fordelingen af haplotyper for de besætninger er angivet som cirkeldiagrammer.



For hver besætning er haplotype fordelingen angivet som et cirkeldiagram. Farverne svarer til andelen af de enkelte haplotyper. De genetiske afstande (D) er angivet på grenene.

Hudsons homogenitets test (Hudson 1992) baseret på haplotype (H_{ST}) og sekvens (K_{ST}) blev udført parvis for de fire populationer (tabel 7). Alle sammenligningerne var signifikante ($P < 0.05$ eller $P < 0.01$), hvilket vidner om struktur i vores data materiale.

Tabel 7. Parvis homogenitetstest for haplotypedata (H_{ST}) og sekvensdata (K_{ST}) for de fire besætninger.

	H_{ST}	K_{ST}
Kortegaard & Vesterbølle	0.0811**	0.0345*
Kortegaard & Westergaard	0.3040**	0.2179**
Kortegaard & Oregaard	0.1511**	0.0964**
Vesterbølle & Westergaard	0.3156**	0.2117**
Vesterbølle & Oregaard	0.1447**	0.1377**
Westergaard & Oregaard	0.4469**	0.4364**

($P < 0.05$ *, $P < 0.01$ **)

Nei's parvise genetiske afstande (Nei 1972) samt genetiske lighed (identity) for AFLP-data er anført i tabel 8. Der observeredes kun genetisk afstand mellem Oregaard besætningen og de restende, men denne var dog begrænset. Der påvistes næsten igen forskelle mellem populationerne og de kan for AFLP-datas begrund antages for at være identiske.

Table 8. Parvise sammenligninger af Nei's genetiske afstande (D) og genetiske identitet (I) for de fire besætninger på basis af AFLP-data henholdsvis under og over diagonalen.

	Kortegaard	Vesterbølle	Westergaard	Oregaard
Kortegaard		1.000	1.000	0.988
Vesterbølle	0.000		0.999	0.987
Westergaard	0.000	0.001		0.976
Oregaard	0.012	0.013	0.024	

De parvise sammenligninger for F_{ST} for AFLP-data er angivet i tabel 9. Der observeredes kun signifikant forskel mellem Westergaard og Oregaard besætningerne resten af sammenligningerne viste ikke signifikant differentiering.

Tabel 9. Genetisk differentiering mellem populationerne baseret på parvise sammenligninger af AFLP-data (F_{ST}) for de fire besætninger.

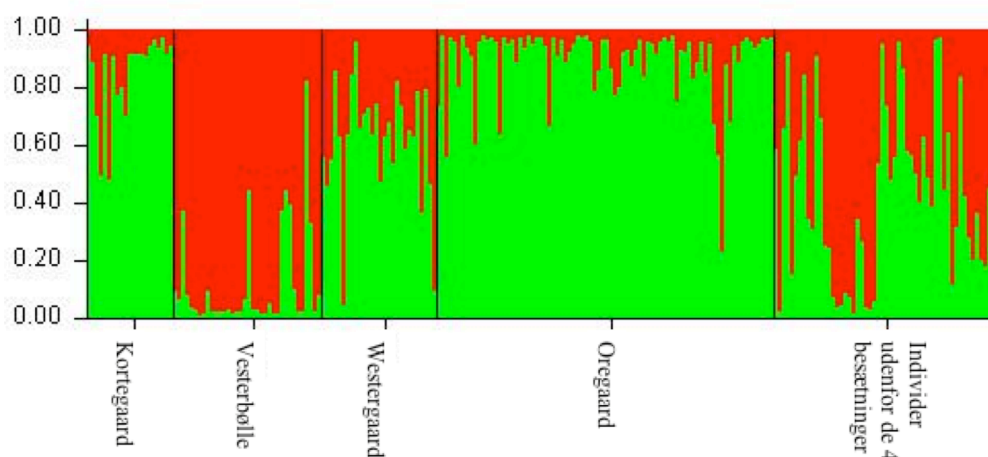
	Kortegaard	Vesterbølle	Westergaard	Oregaard
Kortegaard		-	-	-
Vesterbølle	0.000		-	-
Westergaard	0.000	0.003		-
Oregaard	0.025	0.026	0.047*	

($P < 0.05^*$)

Populations struktur

På baggrund af resultaterne fra *Structure* estimeredes det mest sandsynlige antal grupper til to. Dette inddelte individerne som vist i figur 2. Det ses, at individerne fra Kortegaard og Oregaard overvejende falder i samme gruppe (grøn). Vesterbølle besætningens individer faldt primært i den anden (røde) gruppe. Individerne fra Westergaard besætningen lignede en opblanding af de to grupper. For de individer, der ikke hørte under en af de fire populationer, observeredes stor variation i de enkelte tilhørsforhold.

Figur 2. Plot af individuelle sandsynligheder for tilhørsforhold ved inddeling af den samlede population i 2 grupper baseret på mikrosatellit genotyper.

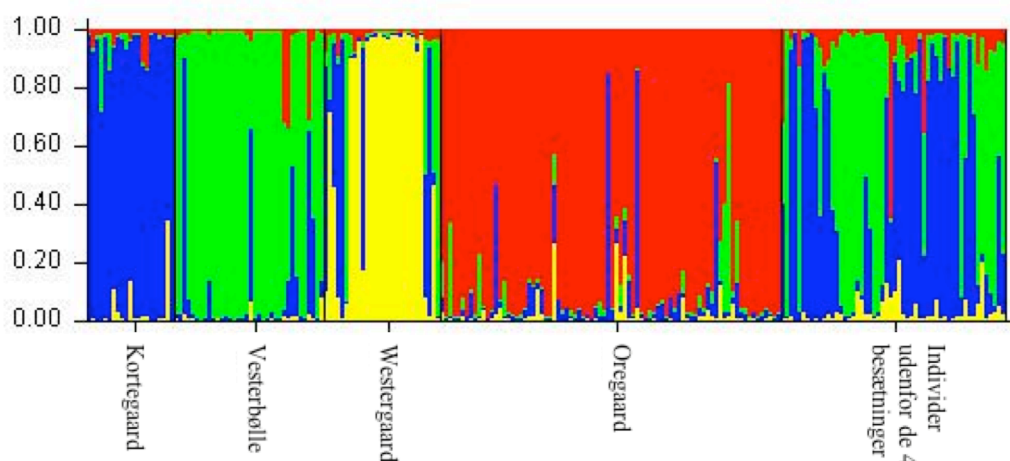


Hver vertikal bar repræsenterer et individ. Farverne svarer til populationer, hver bar er enten én eller inddelt i flere farver, svarende til den andel af individets genotype, som tilhører i de respektive populationer. Hver population er adskilt af en vertikal sort bar.

Strukturama estimerede det mest sandsynlige antal af populationer til fire på baggrund af de 23 loci. Dette gjorde sig både gældende med data fra den samlede population eller data fra udelukkende Kortegaard, Vesterbølle, Westergaard og Oregaard blev brugt.

Når *Structure* skulle inddele den samlede population i fire grupper fordeltes de individuelle tilhørscoefficients sig som vist i figur 3. Programmet genfandt de fire populationer Kortegaard (blå), Vesterbølle (grøn), Westergaard (gul) og Oregaard (rød). De individer der ikke hørte under en population blev fortrinsvis assignet til Kortegaard og Vesterbølle grupperne. For hver gruppe observeredes individer, der havde mere lighed med en anden gruppe, end den de var kategoriseret i. For alle populationer gjorde det sig gældende, at der forekom individer, der havde en højere genetisk lighed med én eller flere af de andre populationer end den de hørte under.

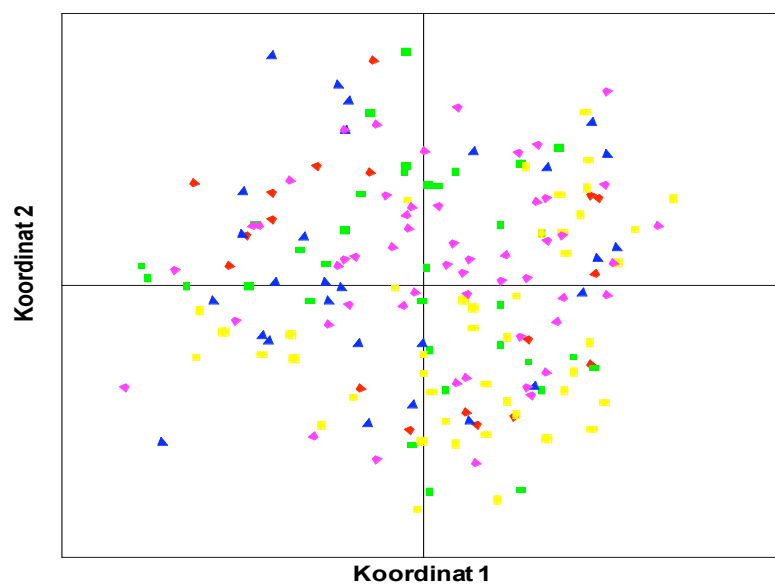
Figur 3. Plot af individuelle sandsynligheder for tilhørsforhold ved inddeling af den samlede population i 4 grupper baseret på mikrosatellit genotyper.



Hver vertikal bar repræsenterer et individ. Farverne svarer til populationer, hver bar er enten én eller inddelt i flere farver, svarende til den andel af individets genotype, som tilhører i de respektive populationer. Hver population er adskilt af en vertikal sort bar.

En Principal Coordinate Analysis (PCA) for alle individer på baggrund af AFLP-data er vist i figur 4. Den første akse beskriver 36.4% af variationen og den anden akse beskriver 18.8% af den totale variation. Det ses, at de fire besætninger ikke fremstår separat, men nærmere at individerne er spredt bredt mellem hinanden. Det kan på baggrund af denne analyse ikke gives belæg for at der skulle være separate grupper i racen.

Figur 4. PCA for alle individer på baggrund af AFLP-data.



Farverne repræsenterer henholdsvis Kortegaard (rød), Vesterbølle (grøn), Westergaard (blå), Oregaard (gul) og individer fra de mindre besætninger (pink).

Diskussion

Genetisk diversitet

Jysk kvæg er en genetisk divers gruppe på trods af den lille populations størrelse på omkring 350 individer (Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri 2007). Vi samlede 180 individer hvilke både repræsenterede nulevende og forgangne dyr. Der observeredes 19 haplotyper for den samlede besætning (tabel 1), hvilket er et højt antal sammenlignet med lignende studier (Mannen 1998, Withen 2005). Der var ikke evidens for selektion (tabel 1), hvilket stemmer overens med det forventede for mitokondrielle d-loop sekvenser. Kortegaard og Vesterbølle var de mest diverse besætninger, hvilket må tilskrives, at der er en meget lille relation mellem de enkelte køer i besætningerne. Oregaard og Westergaard havde et meget lavt antal haplotyper i deres besætninger, henholdsvis 4 og 2 (figur 1).

Da mtDNA'et er maternalt nedarvet kan haplotype diversiteten ses som et mål for hvor stor kohorten af køer er. Hvis mange af køerne i en besætning er mor og datter, søstre eller på anden vis har samme ophav, vil de have samme haplotype, og besætningen vil dermed være genetisk homogen. Alle besætninger, med undtagelse af Oregaard besætningen, indeholdt et antal unikke haplotyper. Der vil derfor være en interesse i at alle, både store og små, besætninger bevares, for at bibeholde mest mulig variation. Hvis kun enkelte besætninger bevares, kan resultatet blive at muligvis værdifulde haplotyper kan gå tabt.

Jysk kvæg er på baggrund af mikrosatellitdata (tabel 2) en heterogen population, der ligger i den højere ende med hensyn til heterozygositet og allel antal sammenlignet med andre Europæiske racer (Edwards 2003, Freeman 2005, Kantanen 2000, Tapio 2006, Wiener 2004). På trods af den meget heterogene profil, som samtlige besætninger havde, blev der observeret indavl i Vesterbølle besætningen. Oregaard besætningen viste tegn på introduktion af nye alleler (tabel 2). Grundet at flere af besætningerne kan stamme fra samme gruppe, kan en opblanding af alle besætningerne være med til at modvirke indavl i den enkelte besætning (Balloux 2002, Goudet 1994). Kigger man på den samlede population af Jysk kvæg ses en overvægt af heterozygoter i forhold til HWE (tabel 2). Dette må skyldes en introduktion af fremmede alleler, hvilket kan være forekommet ved, at et eller flere dyr er blevet registreret som Jysk kvæg uden at være det, og på den måde har bidraget med genetisk materiale hos de efterfølgende generationer.

Variationen i AFLP-fragmenter var ens for alle fire besætninger samt for den samlede besætning (tabel 3). Dette kan skyldes, at AFLP generelt giver et stort antal fragmenter, men med lille information for hvert enkelt fragment. Mikrosatellitter derimod giver et mindre antal alleler, men med meget mere information for den enkelte allel. Nye AFLP restriktionsskærringssteder opstår som følge af punktvis mutationer, mens ændring i længden af mikrosatellitter opstår ved replikations- eller rekombinationsfejl. Sidstnævnte forekommer oftest og tiden fra at én eller flere populationer har divergeret vil være afgørende for om det vil være muligt at påvise et split med AFLP som markør, men mindre der benyttes et højt antal (Buntjer 2002, Dasmahapatra 2008, Gaudel 2004).

Genetisk varians

Den procentvise fordeling af den genetiske varians viste for alle tre markører (mtDNA, mikrosatellitter og AFLP), at største parten af variationen lå indenfor populationerne (tabel 4). Dette ses som et udtryk for at racen genetisk er meget homogen. Den største del af variationen mellem de enkelte besætninger observeredes for mtDNA'et. Dette kan skyldes, at de enkelte besætninger ikke har udvekslet køer, men kun tyre (Gaudel 2004, Withen 2005). Tidligere studier af mikrosatellit data har påvist at største delen af variationen ligger imellem individerne i populationerne, hvilket stemmer helt overens med resultatet for det Jyske kvæg (Tapio 2007).

At største parten af den genetiske variation for AFLP-data (tabel 4) lå imellem individerne og ikke mellem besætningerne kan ses som et udtryk for, at separationstiden, hvori de fire besætninger har været holdt adskilt, ikke har været lang nok til, at der kunne akkumuleres nok nye mutationer og dermed restriktionsskærringssteder eller at antallet af fragmenter har været for lille til at kunne påvise variation (Bensch 2005, Bonin 2007, Negrini 2007). Simulations studier har desuden vist, at ved brug af dominante markører skal der generelt bruges 4 til 10 gange så mange loci som ved codominante markører (Bonin 2007, Mariette 2002, Ga). I dette studie anvendte vi 23 mikrosatellit loci og 58 AFLP loci. Havde vi anvendt 100 eller flere AFLP loci, havde resultatet måske været anderledes.

Populations differentiering

På baggrund af de parvise mtDNA og mikrosatellit værdier fandtes der signifikant forskel mellem populationerne (tabel 5). De fire besætninger kan derfor

anses som værende genetisk forskellige. Overordnet fandtes der kun evidens for signifikant forskel med hensyn til mtDNA'et hvilket også var den markør hvor besætningerne var mest differentieret. Da begge koefficienter for genetisk differentiering; Φ_{ST} (mtDNA) og θ_{ST} (mikrosatellitter) er følsomme overfor populationsstørrelse, og der var stor variation i denne, giver dette en vis usikkerhed på estimatet.

Analysen af AFLP-data gav ikke evidens for en differentiering af besætningerne (tabel 9). Imellem de besætninger, hvor der blev påvist genetisk afstand (tabel 8), var denne kort. Besætningerne var grundlæggende identiske på baggrund af AFLP-markøren.

De genetiske afstande (D) og den genetiske lighed (I) af mtDNA'et (tabel 6 & figur 1) de fire besætninger imellem viste Oregaard og Kortegaard som de mest identiske populationer, efterfulgt af Westergaard og Vesterbølle. Sidstnævnte var den besætning, der var mest forskellig fra de tre andre. Dette stemmer godt overens med beskrivelserne af de tre grupper af Jysk kvæg; Gammeldags Jysk malkekvæg (Kortegaard og Oregaard), Westergaard gruppen (Westergaard) og det rekonstruerede Jyske kvæg (Vesterbølle).

En homogenitets test (tabel 7) på både haplotype- og sekvensdata viste for begge signifikante forskelle, hvilket bevidner om struktur i data materialet og at populationerne derfor må anses som værende forskellige (Hudson 1992).

Populations struktur

At de fire besætninger ikke genfindes ved en *Structure* kørsel (figur 2), men at populationen deles op i to grupper, kan skyldes at nogle af besætningerne tilhører samme stamme (Balloux 2002, Waples 2006). Dette stemmer godt overens med, at programmet generelt finder den øverste hierarkiske struktur i et givent sample (Evanno 2005). Resultatet understøtter de tidligere analyser, og viser igen Kortegaard og Oregaard som en genetisk enhed og Vesterbølle som en enestående gruppe. Westergaard besætningen er genetisk set en blanding af de to grupperinger.

Strukturama opdelte den samlede population i fire grupper. Når dette resultat anvendes i *Structure* (figur 3) genfandt programmet de fire besætninger. De var alle distinkte, men enkelte individer havde en genotype profil der stemte bedre overens med en af de andre besætninger. Det tyder på at der her været en vis udveksling af individer de fire besætninger imellem. For eksempel ville en udveksling af tyre de fire

besætninger imellem bidrage til introgression af alleler. Alternativt kunne variationen skyldes en fælles genetisk variation, der er blevet bibeholdt i de respektive besætninger. Dette må dog antages at være mere usandsynligt end udveksling af individer besætningerne imellem. Individerne, der ikke tilhører nogle af de nævnte grupper, blev hver især assignet til en af førnævnte grupper på baggrund af deres genotype profil, primært Kortegaard og Vesterbølle besætningerne.

Ikke overraskende viste AFLP-data ingen tegn på struktur imellem individerne i en PCA, hvilket skyldtes den lave differentiering.

Konklusion

Undersøgelsen viste at Jysk kvæg som race, trods en lille størrelse, indeholder en høj grad af diversitet. Indenfor racen eksisterer følgende fire grupper: Kortegaard, Vesterbølle, Westergaard og Oregaard, hvilket er i overensstemmelse med besætningerne. Imellem de enkelte grupper er graden af differentiering dog meget begrænset. Genetisk set er Kortegaard og Oregaard besætningerne de tættest beslægtede. Vesterbølle besætningen er den mest differentierede fra de resterende. Et sted imellem de to grupper ligger Westergaard besætningen, som er tættest genetisk relateret til Kortegaard og Oregaard gruppen. Dette stemmer overens med den påståede gruppering af racen dog med den forskel, at Kortegaard og Oregaard er differentierede og ikke udgør én gruppe, men to separate. Individerne udenfor de fire hovedbesætninger indeholder sjældne haplotyper, hvilket muligvis skyldes introgression. Mikrosatellit-genotypeprofilerne assignede primært individerne til Kortegaard og Vesterbølle besætningerne. De må derfor anskues som genetisk set at tilhørende disse respektivt.

For den samlede bestand tydede mtDNA-profilerne på, at kørerne i de enkelte besætninger fortrinsvis er blevet holdt i deres besætning, mens mikrosatellitprofilerne vidnede om introgression af alleler, for eksempel ved udveksling af tyre imellem besætningerne.

Taksigelser

I forbindelse med udarbejdning af rapporten har følgende personer bidraget med vejledning og hjælp til projektet:

Peter Gravlund, amanuensis

Eline D. Lorenzen, postdoc

Rasmus Heller, ph.d.-studerende

Anders Albrechtsen, ph.d.-studerende

Pernille Selmer Olsen, laboratorietekniker

Ruth Bruus Jakobsen, kemotekniker

Natascha Jakobsen, laboratorietekniker elev

Hans Siegismund, lektor

Tom Gilbert, lektor

Torkild Liboriussen, seniorforsker

Desuden takkes familien Benzon for hjælpen ved udtagning af blodprøver.

Referencer

Hjemmesider

1. <http://danske-dyr.dk/dyr.php?id=90004&difficulty=hard&all=1>
2. <http://www.dffe.dk/Default.asp?ID=27116&M=News&PID=275345&NEWSID=5897>
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Amplified_fragment_length_polymorphism
4. http://en.wikipedia.org/wiki/D-loop_replication
5. http://en.wikipedia.org/wiki/Genetic_variability
6. <http://en.wikipedia.org/wiki/MtDNA>
7. <http://historie-online.dk/special/dyr/kvaeg.htm>
8. <http://www.biodiverse.dk/artik/fyens01.htm>
9. <http://www.gamle-husdyrracer.dk/nyhed/rapport/iec/kap4.htm>
10. [http://www.glr-chr.dk/pls/glrchr/chrmenu\\$.menu](http://www.glr-chr.dk/pls/glrchr/chrmenu$.menu)
11. http://www.hjerlhede.dk/dk/samlinger/husdyr/Jysk_graabroget_kvaeg.htm

Litteratur

Ajmone-Marsan, P. et. al.: AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Anim. Genet.* (1997) 28, 418-426.

Akaike, H.: A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* (1974) 19, 716-723.

Anderson, S. et. al.: Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* (1982) 156, 683-717.

Bensch, S. et. al.: Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Mol. Evol.* (2005) 14, 2899-2914.

Bleas, M. J. et. al.: Amplified fragment length polymorphism (AFLP): A review of the procedure and its applications. *Jour. Of Indust. Microbiol. & Biotech.* (1998) 21, 99-114.

Barker, J. S. F: Conservation and management of genetic diversity: a domestic animal perspective. *Can. J. For. Res.* (2001) 31, 588-595.

Balloux, F. et. al.: The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.* (2002) 11, 155-165.

Bonin, A. et. al.: Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol. Evol.* (2007) 16, 3737-3758.

Buntjer, J. B. et. al.: Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting. *Heredity* (2002) 88,46-51.

Christiansen, F.B.: Theories of population variation in genes and genomes –lecture notes in molecular population genetics. (2007) Princeton University Press.

Cymbron, T et. al.: Mitochondrial sequence variation suggest an African influence in Portuguese cattle. *Proc. R. Soc. Lond. B.* (1999) 266, 597-603.

- Dasmahapatra, K. K. et. al.: *Estimating levels of inbreeding using AFLP markers. Heredity* (2008) 100, 286-2295.
- Edwards, C. J. et. al.: *Feasibility and utility of microsatellite markers in archaeological cattle remains from Viking Age settlement in Dublin. Anim. Genet.* (2003) 34, 410-416.
- European Cattle Genetic Diversity Consortium: *Marker-assisted conservation of European cattle breeds: an evaluation, Animal Genetics* (2006) 37, 475-481
- Evanno, G. et. al.: *Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol.* (2005) 14, 2611-2620.
- Excoffier, L. et. al.: *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics* (1992) 131, 479-491.
- Excoffier, L. et. al.: *Arlequin ver 3.1. An integrated software package for population genetic analysis. Computational and molecular population genetics lab (CMPG). University of Berne. Switzerland.*
- Frankham R. et. al.: *Introduction to conservation genetics.*(2002) Cambridge Press.
- Freeman, A. R. et. al.: *Combination of multiple microsatellite data sets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle. Anim. Genet.* (2005) 37, 1-9.
- Gaudeul, M. et. al.: *Genetic diversity and differentiation in Eryngium alpinum L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. Heredity* (2004) 92, 508-518.
- Holm, S.: *A simple sequentially rejective mutiple test procedure. Scan. Jour. of Statistics* (1979) 6, 65-70.
- Hudson, R. R. et. al.: *A statistical test for detecting geographic subdivision. Mol. Biol. Evol.* (1992) 9, 138-151.
- Huelsenbeck, J. P., et. al.: *Inference of population structure under a Dirichlet process model. Genetics* (2007) 175, 1787-1802.
- Huelsenbeck J. P. et. al.: *Structurama: Bayesian inference of population structure. Bioinformatics* (2007) in press.
- Kantanen, J. et. al.: *Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. Heredity* (2000) 91, 446-457.
- Kimura, M & Ohta, T.: *Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (75) 6, 2868-2872.
- Larkin, M.A. etl.al.: *Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics* (2007) 23, 2947-2948.
- Loftus, R. T. et. al.: *Evidence for two independent domestications of cattle. Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91, 2757-2761.
- Mannen, H. et. al.: *Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese black cattle (Bos taurus). Genetics* (1998) 150, 1169-1175.
- Mariette, S. et. al.: *Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. Mol. Ecol.* (2002) 11, 1145-1156.
- Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri: *Arbejdsplan 2008. Udvalget til bevarelse af genressourcer hos danske husdyr* (2008).
- Negrini, R. et. al.: *Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting. Anim. Genet.* (2007) 38 60-66.

- Nei, M.: *Genetic distance between populations. American Naturalist. (1972) 106, 283-292.*
- Nei, M & Kumar, S: *Molecular evolution and phylogenetics. (2000) Oxford University Press.*
- Oosterhout, C. V. et. al.: *MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol. Ecol. Notes (2004) 4, 535-538.*
- Peakall, R. et. al.: *GENALEX ver.6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol (2006) 6, 288-295*
- Pella, J. et. al.: *The Gibbs and split-merge sampler for population mixture analysis from genetic data with incomplete baselines. Can. J. Fish. Aquat. Sci. (2006) 63, 576-596.*
- Posada, D. & Crandall, K. A.: *Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics (1998) 14, 817-818.*
- Pritchard, J. K. et. al.: *Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics (2000) 155, 945-959.*
- Raymond, M. et. al.: *GENEPOP version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. Heredity (1995) 86, 248-249.*
- Rozas, J. et. al.: *DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics (2003) 19, 2496-2497.*
- Taberlet, P. et. al.: *Are cattle, sheep, and goats endangered species? Mol. Ecol. (2008) 17, 275-284.*
- Tamura, K. et. al.: *MEGA4: Molecular evolutionary genetic analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. (2007) 24, 1596-1599.*
- Tapio, I. et. al.: *Prioritization for conservation of Northern European cattle breeds based on analysis of microsatellite data. Cons. Biol. (2006) 20, 1768-1779.*
- Vos, P. et. al.: *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. (1995) 23, 4407-14.*
- Waples, R. S. et. al.: *What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. Mol. Ecol. (2006) 15, 1419-1439.*
- Weaver, R. F: *Molecular Biology (2007), Mc Graw Hill, 4. Udgave.*
- Weir, B. S. et. al.: *Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution (1984) 38, 1358-1370.*
- Wiener, P. et. al.: *Breed relationship and definition in British cattle: a genetic analysis. Heredity (2004) 93, 597-602.*
- Withen, K. B: *En genetisk karakteristik af Agersø-kvæget. (2005)*

Appendiks*Appendiks 1.* Mikrosatellit markører og allel antal.

ABI lane	PCR reaction	Locus	Dye	PCR conditions	Number of alleles
1	1	CSRM60	FAM	61°C, 30 cycles	7
		CSSM66	FAM		10
		HEL1	JOE		9
		INRA063	JOE		4
		INRA037	NED		6
1	2	INRA005	FAM	58°C, 30 cycles	3
		HAUT27	JOE		6
2	3	BM1818	JOE	60°C, 30 cycles	-
		ETH152	NED		7
		HEL9	NED		9
		ILST006	FAM		8
2	4	HEL5	FAM	54°C, 30 cycles	9
		HEL13	FAM		5
3	5	INRA035	FAM	63°C, 30 cycles	-
		ILST005	FAM		2
		MM12	NED		5
		ETH185	NED		-
3	6	INRA032	NED	54°C, 30 cycles	-
		HAUT24	JOE		7
4	7	INRA023	JOE	Standard protocol	9
		TGLA122	JOE		-
		BM2113	FAM		-
		ETH225	NED		7
		ETH10	FAM		6
		SPS115	FAM		5
		TGLA126	JOE		4
		TGLA227	FAM		-
		BM1824	NED		5
		ETH3	NED		7
		TGLA53	FAM		12

Appendiks 2. Haplotyper.

	1	7	8	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4	5	6	6	6	6	6	7									
	6	2	5	4	2	9	0	7	4	0	1	2	0	1	5	1	5	2	5	0	4	1	2	6	4	1	7	1	8	3	4	5	1	8	K	V	W	O	U
Ref.	C	A	T	T	T	C	C	G	T	C	G	T	T	T	T	G	C	T	C	T	C	G	T	T	A	A	A	C	-	-	T	C	C						
H1	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	2	
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	G.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	1	
H4	.	.	.	C	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	-	
H5	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	-	
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	T	.	.	C	.	.	.	.	5	
H7	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	12	
H8	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	2	
H9	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	1	
H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	-	
H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	C	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	T	.	-		
H12	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	13	
H13	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	2	
H14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	-	
H15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	1	
H16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	-	
H17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	2	
H18	.	.	.	.	.	T	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	3	
H19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	-	

Baseret på 737 bp. Reference (Anderson 1982). Antallet af haplotyper for de enkelte populationer Kortegaard (K), Vesterbølle (V), Westergaard (W), Oregaard (O) og individer der ikke hører under nogle af de fire populationer (U).