

# En genetisk karakteristik af Agersø-kvæget



Agersø-kvæget (foto Stig Benzon)



DEPARTMENT OF  
EVOLUTIONARY  
BIOLOGY  
ZOOLOGICAL INSTITUTE

Rapporten er udarbejdet af

Kim Bidstrup Withen, Specialestuderende  
Peter Gravlund, Post doc.  
Bo Vest Pedersen, Institutleder

Evolutionsbiologisk Afdeling  
Biologisk Institut  
Københavns Universitet



## Resumé og konklusion

Vi har i denne undersøgelse foretaget en genetisk karakteristik af Agersø-kvæget med henblik på at besvare spørgsmål om racens genetiske integritet og relation til Jysk kvæg og RDM-70. Sekundært er den genetiske variation, graden af indavl, samt identifikation af dyr af blandet oprindelse blevet beskrevet for kvæget. Karakteriseringen af de tre kvægracer er foretaget på baggrund af tre forskellige markørsæt, *det mitochondrielle d-loop*, *29 autosomale mikrosatellitter* og *AFLP metoden*. I undersøgelsen indgik 45 Agersø-kvæg, 48 Jysk kvæg og 32 RDM-70, som alle kommer fra Danmarks Husdyrpark, Oregaard.

Kvantificeringen af de genetiske forskelle mellem Agersø-kvæget og de to andre racer gav et *tydeligt* billede af, at Agersø-kvæget tilhører en population, der er genetisk forskellig fra Jysk kvæg og RDM-70. Denne konklusion er truffet på baggrund af entydige resultater fra de tre markører. De genetiske relationer til de to andre racer viste, at Agersø-kvæget er nærmere beslægtet RDM-70 end Jysk kvæg. Dette er i overensstemmelse med racernes udviklingshistorie, da RDM-70 er grundlagt med gener fra Ø-kvæget. Det skal understreges, at vi ikke har be- eller afkræfte Agersø-kvægets autenticitet som Ø-kvæg.

Den genetiske variation indenfor kvæget var sammenlignelig med variationen indenfor RDM-70 og Jysk kvæg og på samme niveau, som hos moderne racer. Den videre analyse af data fra mikrosatellitterne viste, at der ikke er et statistisk grundlag for at postulere indavl hos nogen af de tre racer. Vi har endvidere på baggrund af de tre markører identificeret 12 dyr blandt Agersø-kvæget, hvis beslægtethed med dyr udenfor racen er over 39 procent (arbitrær værdi). Det anbefales, at disse dyr ikke indgår i et eventuelt senere avlsarbejde med Agersø-kvæget.

**Bo Vest Pedersen**

**Peter Gravlund**

**Kim Bidstrup Withen**

## Indledning

### *Problemstilling*

Familien Benzon fandt i starten af halvfemserne en lille besætning af kvæg på Kratgaarden, Agersø, som de og mange andre mener, er de sidste efterkommere af den gamle danske landrace, *Ø-kvæg*. Synspunktet underbygges af den tidligere ejer Lars Peter Nielsens udsagn om Agersø-kvægets oprindelse ([link 1](#)), og deles af Dr. Nils Dahlbeck, Sverige, og Marleen Felius, Holland ([link 2](#)). Argumenter for og imod Agersø-kvægets status, som *Ø-kvæg*, er baseret på træk i kreaturenes fænotype, samt af den tidligere ejers udsagn om besætningens historie. Der har ikke tidligere været foretaget nogen undersøgelse af kvægets oprindelse.

Med udgangspunkt i denne problemstilling har vi lavet en genetisk karakteristisk af Agersø-kvæget, samt af de gamle danske racer, RDM-70 og Jysk kvæg, og resultaterne er blevet brugt til en videnskabelig argumentation på problemstillingens to centrale spørgsmål

- kan Agersø-kvæget på et genetisk grundlag adskilles fra racerne RDM-70 og Jysk kvæg?
- hvad er den genetiske relation mellem de tre racer?

### *Ø-kvæget*

Kvæg er gennem tiderne blevet spredt fra domestificeringsområderne i Nærøsten med migrerende folkegrupper, og en diversifikation af arten (*Bos taurus*) har fundet sted lige siden.

Differentieringen af arten i racer er opstået, som en konsekvens af forskelle i levevilkår og bøndernes hensigt med kvæget. Racer, som er opstået under disse forhold benævnes under et for *landracer* (link 3).

Kvæghold her i landet har en historie, som går omkring 6000 år tilbage (Aaris-Sørensen, 1998), men på trods af dette skelnede man i begyndelsen af 1800-tallet kun mellem to landracer, nemlig Jysk kvæg og Ø-kvæget. Man kan således tænke sig en stor diversitet indenfor kvæget på øerne, hvilket kan bekræftes i litteraturen, hvor man finder varianter som Bornholmeren og Samsøkoen (link 4). Ø-kvæget, som havde en udbredelse fra Skåne, Halland og Blekinge over de danske øer til Slesvig, dominerede i denne periode på Fyn, Sjælland og Øerne (Petersen, 2001). Racen beskrives som værende lille og kantet, spinkelt bygget med ujævn ryg, tynde lår og dårlig benstilling og med højt rejst hoved. Det forekom i farverne: gul, rød, rødbrøget, sort, sortbrøget og brun. Vægten var cirka 300 kg, og racen var omkring 100 cm høj. Ø-kvæget, som regnes til mellemformen (både malke- og kødkvæg), satte angiveligt ikke meget kød og mælkeydelsen var generelt ikke særligt høj (Andersen et al., 2003; Petersen, 2001).

I midten af det 19. århundrede påbegyndtes en forædling af Ø-kvæget, hvor den røde lød og mælkeydelsen var de karakterer, man samlede sig om på Øerne. Forædlingsmaterialet til Sjælland og Lolland-Falster blev hovedsageligt indført fra Angel (halvøen mellem Flensborg fjord og Slien), men også andre røde kvægslag blev anvendt herunder Jysk kvæg. Anglerkvæget blev også anvendt som forædlingsmateriale til det fynske kvæg, dog ikke i samme omfang, men i stedet kom lødekøerne (drægtige køer, som blev drevet over land til bryggerierne og brænderierne i de større byer østpå i landet) til at spille en stor rolle i udviklingen af det fynske røde kvæg. Lødekøerne kom fra kvægslagene i Nordslesvig og Sønderjylland dvs. fra henholdsvis det Nord-slesvigske kvæg og Ballum kvæget (Andersen, 2003). I 1878 nåede man så vidt, at man på landmandsforsamlingen i Svendborg samlede alle afdelinger af rødt kvæg under betegnelsen *Anglere* eller *rødt dansk kvæg af ren race*. Denne betegnelse ændres senere til Rød Dansk Malkerace forkortet RDM. Denne nye rent danske race var Ø-kvæget overlegen med hensyn til mælkeydelse, hvilket bevirkede en kraftig nedgang i antallet af dyr af den gamle danske landrace. Nogle gårde holdt imidlertid ved deres slægtskvæg, således overlevede kvæget i små spredte besætninger.

### *Genetiske markører*

Vi har valgt at anvende tre forskellige genetiske markører til at belyse problemstillingen. Disse er den mitochondrielle kontrolregion (d-loop), mikrosatellitter (VNTR), samt markørerne, som fremkommer ved *Amplified fragment length polymorfisme* (AFLP) metoden. Vores data kommer således respektivt fra sekvensvariation i den mitochondrielle kontrol region (d-loop), allelfrekvens variation i mikrosatellitter (fra Utrecht listen, link 5), samt fra *EcoRI/TaqI* AFLP proceduren med primer kombinationerne E35/T32, E39/T33 og E45/T32 (Ajmone-Marsan, 1997; Vos et al., 1995).

De tre markører komplementerer hinanden gennem forskelle i evolutionsmåde, hvorved man opnår et mere nuanceret billede af de genetiske relationer mellem racerne.

## Materialer og metoder

### Prøver

Blodprøver fra 45 Agersø-kvæg, 16 RDM-70 og 48 Jysk kvæg blev udtaget fra kvægbesætningen tilhørende Gorm Benzon, Oregaard (*CHR nr. 81335*), og yderligere blev der udtaget 16 blodprøver fra RDM-70 tilhørende Jespersens stamme (*CHR nr. 20426*). Prøverne blev opbevaret i 6 ml Vacurette glas tilsat EDTA-buffer.

### Sekvensering af d-loop

DNA blev ekstraheret og oprenset fra blodet jævnfør Qiagens *DNeasy Tissue Handbook*, hvorefter d-loop regionen blev mangfoldiggjort ved PCR-metoden, hvor de to flankerende primere var

P1: 5'- CTG CAG TCT CAC CAT CAA CC -3' (Loftus et al., 1994)

P4: 5'- AGA GTT AAC AGG AAG GCT GG -3' (Kim et al., 2003)

Til 1µl oprenset DNA blev der tilsat 5µl PCR-buffer, 5µl af hver af primerne, 14µl ddH<sub>2</sub>O, 20µl GATC-miks og 0,2µl TAQ-polymerase.

Kørselsparametrene var

95°C, 10 min. x 1

95°C, 1 min.; 57°C, 1 min.; 72°C, 1 min. x 35

72°C, 5 min. x 1

PCR-produktet blev oprenset ved hjælp af *Qiaquick spin kolonne*, og dets koncentration blev målt på et spektrofotometer (Eppendorf Biophotometer).

Til den cykliske sekvensering blev primeren P1, samt tre interne primere P2, P3 og P5 anvendt

P2: 5'- CGA GAT GTC TTA TTT AAG AGG -3' (Cymbron et al., 1999)

P3: 5'- CGC TCC GGG CCC ATA AAC CG - 3' (Gravlund & Withen)

P5: 5'- GCC TGC GTT TAT ATA TTG AC -3' (Gravlund & Withen)

P1 & P2 og P3 & P5 deler d-loopet op i to overlappende fragmenter.

Til omkring 20 ng ds-PCR produkt tilsattes 1µl 3,2 pmol primer og dernæst ddH<sub>2</sub>O til det samlede volumen var 12µl. Herefter blev der tilsat 8µl af et miks bestående af 2µl BigDye reaktionsmiks, 3µl 5 x buffer og 3µl H<sub>2</sub>O.

Kørselsparametrene på PTC-100 med en "ramp rate" på 1 °Csek<sup>-1</sup> var

1: 96°C, 30 sek.

2: 50°C, 15 sek.

3: 60°C, 4 min.

4: 24 x (1-3)

Efter endt kørsel blev produkterne oprenset ved hjælp af *DyeEx 2.0 Spin kit* (QIAGEN), og efterfølgende adskilt på ABIen (ABI Prism<sup>®</sup> 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems).

Resultaterne blev analyseret ved brug af programmet *Sequencher*<sup>TM</sup> 3.1.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI), hvor de to sæt af komplementære strenge fra hvert dyr blev sammenlignet og sat sammen til en sekvens.

#### *Genotypning af mikrosatellitter*

Oprensede DNA fra d-loop sekvenseringen blev genotypebestemt for de 30 mikrosatellitter anbefalet i Utrecht listen (link 5). Følgende elleve mikrosatellitter blev bestemt ved brug af StockMarks<sup>®</sup> *Cattle Paternity PCR Typing Kit* (Applied Biosystems); tgl227, bm2113, tgl53, eth10, sps115, tgl126, tgl122, inra23, eth3, eth225 og bm1824. PCR betingelser jævnfør protokollen, men de anbefalede reaktionsvolumer blev halveret. De øvrige 19 mikrosatellitter blev multiplexet i seks systemer efter anbefaling fra K. Moazami-Goudarzi, INRA, Jouy-en-Josas (personligt kommunikeret) ved hjælp af QIAGEN<sup>®</sup> Multiplex PCR kit. Reaktionsbetingelserne for de pågældende systemer er angivet i tabel 1. Fragmenterne efter PCR reaktionerne 1 og 2, 3 og 4, samt 5 og 6 blev endvidere analyseret i samme bane på ABIen (ABI Prism<sup>®</sup> 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems), således, at hvert individ genotypes for de 30 mikrosatellitter ved analysen af fire lanes.

Allel størrelserne blev bestemt ved hjælp af programmerne *Genescan 3.1*<sup>TM</sup> og *Genotyper 2.0*<sup>TM</sup> (Perkin Elmer) og korrigeret efter de internationale standarder, *INRA2000* og *Giessen2000*, som blev kørt på hver gel. De to standarder blev rekvireret gennem henholdsvis Katayoun Moazami-Goudarzi, INRA ([goudarzi@biotec.jouy.inra.fr](mailto:goudarzi@biotec.jouy.inra.fr)) og George Erhardt, Giessen ([Georg.Erhardt@agr.uni-giessen.de](mailto:Georg.Erhardt@agr.uni-giessen.de)).

#### *AFLP*

AFLP metoden blev foretaget af *Keygene Genetics*, Wageningen (Holland).

Analysen blev udført med restriktionsenzymene *EcoRI* og *TaqI* og primer kombinationerne E35/T32, E39/T33 og E45/T32 (Ajmone-Marsan, 1997; Vos et al., 1995).

Metoden anvendes i *RESGEN* projektet (link 6), hvorfor muligheden for en senere sammenligning med racer typet i dette projekt foreligger.

#### *Statistiske analyser*

##### Mitochondrielle d-loop

Sekvenserne fra de enkelte dyr blev alignet ved hjælp af *ClustalW* (Thompson et al., 1994) integreret i programmet *Bioedit 5.0.9* (Hall, 1999), hvorefter variationen i d-loopet blev beskrevet gennem nukleotid diversiteten,  $d_x$  (Nei, 1987; ligning 10.6), haplotype diversiteten,  $h$  (Nei, 1987; ligning 8.4) og middel parvise forskelle,  $k$  (Tajima, 1983). Størrelserne blev beregnet ved hjælp af *DnaSP 4.0* (Rozas et al., 2003) og *MEGA 2.1* (Kumar et al., 2001).

Distancen mellem sekvenser blev bestemt som p-distancen (Nei & Kumar, 2000; ligning 2.1). Dette estimat af afstanden blev valgt, da ingen af vores genetiske afstande er over 0,1 (største afstand er 0,038). Under denne værdi giver for eksempel *Tamura-Nei*, *Tamura*, *Kimura-2P* og *Jukes-Cantor* korrektionerne samme estimat (Nei & Kumar, 2000 s.41).

Fordelingen af den genetiske variation blev estimeret gennem en hierarkisk variansanalyse, *AMOVA* implementeret i Arlequin 2.0 (Schneider, 2000), hvor også de parvise  $\Phi_{ST}$  værdier mellem racerne

blev genereret og signifikant testet. Endvidere blev Hudsons homogenitets test (Hudson, 1992) udført ved brug af programmet *Population Structure* (Siegismund, 2001), hvor også signifikansen af  $H_{ST}$  og  $K_{ST}$  blev bestemt. På baggrund af signifikante  $\Phi_{ST}$ ,  $H_{ST}$  og  $K_{ST}$  værdier mellem racer kan man drage konklusioner om racernes genetiske integritet.

Vi har endvidere testet, om vores data beskriver d-loopet, som værende selektivt neutralt. Dette er gjort ved hjælp af Tajima's  $D$  teststørrelse (Tajima, 1989).

Table 1. De 30 loci, farvemærkningen, multiplexingen og reaktionsbetingelser

ABI Lane	PCR Reaktion	Locus	Mærkning	PCR betingelser
1	1	CSRM60	FAM	61 °C, 30 cykler
		CSSM66	FAM	
		HEL1	JOE	
		INRA063	JOE	
		INRA037	TAMRA	
1	2	INRA005	FAM	58 °C, 30 cykler
		HAUT27	JOE	
2	3	BM1818	JOE	60 °C, 30 cykler
		ETH152	TAMRA	
		HEL9	TAMRA	
		ISLT006	FAM	
2	4	HEL5	FAM	54 °C, 30 cykler
		HEL13	FAM	
3	5	INRA035	FAM	63 °C, 30 cykler
		ILST005	FAM	
		MM12	TAMRA	
		ETH185	TAMRA	
3	6	INRA032	TAMRA	54 °C, 30 cykler
		HAUT24	JOE	
4	7	INRA023	JOE	Standard betingelser
		TGLA122	JOE	
		BM2113	FAM	
		ETH225	NED	
		ETH10	FAM	
		SPS115	FAM	
		TGLA126	JOE	
		TGLA227	FAM	
		BM1824	NED	
		ETH3	NED	
		TGLA53	FAM	

### *Mikrosatellit data*

Vi har testet hver population-locus kombination for afvigelser fra Hardy-Weinberg ligevægt ved hjælp af en eksakt test (Guo og Thompsons, 1992). Unbiased *P*-værdier blev estimeret ved hjælp af Markov kæde metoden (Guo og Thompsons, 1992). En global test over loci og populationer (racer) blev foretaget ved Fisher's metode (Raymond & Rousset, 1995). Den *sekventielle Bonferroni korrektion* blev anvendt til at estimere det globale (*tabel-wide*) signifikansniveau for multiple test (Rice, 1989 og Holm, 1979). Testene for Hardy-Weinberg proportioner blev foretaget ved hjælp af programmet *Genepop 3.4* (Raymond & Rousset, 1995).

Den genetiske variation indenfor racerne blev beskrevet ved den observeret heterozygositet,  $H_O$  unbiased forventet heterozygositet under Hardy-Weinberg ligevægt,  $H_E$  (Nei, 1987) og middel antallet af alleler per race (MNA). Størrelserne er beregnet ved hjælp af *Excel Microsatellite Toolkit* (Park, 2001). Fordelingen af den genetiske variation blev estimeret gennem en hierarkisk variansanalyse, *AMOVA* implementeret i *Arlequin 2.0* (Schneider, 2000), hvor også de parvise  $F_{ST}$  værdier (og signifikansen af disse) mellem racerne blev genereret og testet. Graden af differentiering mellem racer kvantificeres gennem estimatet af  $F_{ST}$  værdien.

De genetiske distancer mellem de tre racer blev beregnet som Nei's distance,  $D_A$  (Nei, 1983) og Cavalli-Sforza & Edwards Chord distance,  $D_C$  (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967). Beregningerne blev foretaget ved programmet *Popdist 1.1.1* (Guldbrandtsen, 2000) og *DISPAN* (Ota, 1993).

De to IAM (*infinite-alleles model*) baseret distancer blev udvalgt på baggrund af deres styrke til at rekonstruere korrekte fylogenetiske relationer ud fra mikrosatellit data (Takezaki & Nei, 1996).

Neighbor-joining metoden (Saitou & Nei, 1987) blev anvendt til at visualisere de genetiske relationer mellem racerne, således blev et fænogram baseret på distancen  $D_A$  og ét på  $D_C$  konstrueret. *Structure 2.1* (Pritchard, 2000) blev anvendt til at demonstrere tilstedeværelsen af populationsstruktur mellem vores racer og endvidere estimere de enkelte dyrs genetiske integritet i forhold til racetilhørsforhold.

### AFLP

Forskellige distancer mellem individer indenfor og mellem racer kan beregnes på baggrund af de omkring 100 bialleliske markører (bånd), som fremkommer ved *EcoRI/TaqI* AFLP metoden under anvendelse af primer kombinationerne E35/T32, E39/T33 og E45/T32. Vi valgte at præsentere datamaterialet gennem en *Principiel KOordinat analyse*, PCO baseret på Jaccard distancen (Jaccard, 1908). Begrundelsen for dette valg af datafremstilling er, at den anbefales af Ajmone-Marsan (2002), samt for at bevare kontinuiteten til resultaterne fra andre forskere herunder især fra projektet RESGEN (Negrini, 2002). Multivariationsanalysen blev foretaget ved brug af programmet *MVSP 3.11* (Kovach Computing Services, Anglesea).

### *Bemærkninger*

Vi har ikke anvendt mikrosatellit *INRA035* på grund af manglende data.

## Resultater

### *Den genetiske variation, d-loop*

Variationen i det mitokondrielle d-loop blev målt gennem nukleotid diversiteten,  $d_x$ , haplotype diversiteten,  $h$  og middel antallet af parvise forskelle (MNPD). Nukleotid diversiteten varierede mellem 0,623 hos RDM-70 til 0,109 hos Agersø-kvæget. Disse racer havde også henholdsvis den højeste og laveste haplotype diversitet (henholdsvis 82,8 og 24,9) og MNPD (henholdsvis 5,38 og 0,873; tabel 2). Sammenholdes diversiteten hos de tre racer med variationen bestemt hos andre racer (Mannen, 1998; Carvajal-Carmona, 2003; Loftus, 1994; Kim, 2003), da ligger Agersø-kvæget og Jysk kvæg i den lavere ende, mens variationen hos RDM-70 er sammenlignelig med mange andre racers. Årsagen til den mindre mangfoldighed hos Agersø-kvæg og Jysk kvæg kan skyldes, at populationer (besætningerne) har været holdt små gennem mange generationer og eventuelt har blodfornyelsen kun eller primært fundet sted gennem anvendelse af tyre. Genetisk drift har således kunne reducere variationen, som ikke er blevet udvidet gennem anvendelsen af tyre, da mitochondriet nedarves maternelt. Den høje frekvens af haplotype 1 hos Agersø-kvæget og haplotype 3 hos Jysk kvæg kan være et tegn på, at drift virker på populationerne, som, hvis den ikke modvirkes, fikserer et haplotype (allel).

Tajima's test var nonsignifikant for de tre racer, hvorfor d-loopet kan antages at være selektivt neutralt.

Tabel 2. Den genetiske variation i d-loopet

	$n$	Antal af haplotyper	Haplotype diversity, $h$ (%)	Nukleotid diversity, $d_x$ (%)	MNPD	Antal polymorfe sites	Tajima's D
Agersø-kvæg	45	5	24,9 (8,35)	0,109 (0,0463)	0,873 (0,625)	8	-1,46 <sup>ns</sup>
RDM-70	31	10	82,8 (4,50)	0,623 (0,163)	5,38 (2,67)	23	-0,345 <sup>ns</sup>
Jysk kvæg	48	4	36,2 (8,26)	0,167 (0,0659)	1,39 (0,869)	8	-0,759 <sup>ns</sup>

Baseret på 802 sites  
ns; non signifikant

### *Den genetiske variation, mikrosatellitter*

DNA polymorfismen bestemt ved hjælp af mikrosatellit data tegnede et lidt andet billede af den genetiske variation indenfor racerne. Jysk kvæg havde her den højeste observeret værdi af heterozygositeten,  $H_O$  mens RDM-70 havde den laveste, hvilket henholdsvis var 0,6128 og 0,5926. Middel antallet af alleler per locus indenfor hver race placerede Agersø-kvæget, som den mest polymorfe, mens Jysk kvæg havde den laveste værdi (henholdsvis 4,93 og 4,62; tabel 3).



De ovennævnte værdier indenfor racer er dog sammenlignelige og konsistente med variationsniveauet fundet hos andre kvægracer (Mateus, 2004; Maudet, 2002; Del Bo, 2001; Kim, 2002; Hansen, 2002; Hanslik, 2000; Martín-Burriel, 1999; Edwards, 2000; Rendo, 2004).

Tabel 3. Variation på baggrund af mikrosatellit data

	Heterozygositet		MNA	Private alleler*
	Forventet, $H_E$	Observeret, $H_O$		
Agersø-kvæg	0,6010 (0,02392)	0,6065 (0,01357)	4,93 (1,31)	9
Jysk kvæg	0,6309 (0,02269)	0,6128 (0,01306)	4,62 (1,15)	11
RDM-70	0,6092 (0,02333)	0,5926 (0,01618)	4,66 (1,47)	14

\* se appendiks 3

Der blev hos de tre racer bestemt et antal private eller racespecifikke alleler (appendiks 3), som de ikke deler med nogle af de to andre. Hos Agersø-kvæget blev der fundet 9 alleler, mens der hos RDM-70 og Jysk kvæg blev bestemt henholdsvis 11 og 14. Denne racespecifikke variation kan måske ekstrapoleres til andre områder i genomet, hvilket medfører, at racerne hver især er genetisk unikke (eller indeholder individer som er det).

De tre racer havde hver især Hardy-Weinberg proportioner, da ingen af  $F_{IS}$ -værdierne var signifikant forskellig fra nul efter Bonferroni korrektionen (tabel 4). Der er således ikke belæg for at postulere indavl.

Tabel 4.  $F_{IS}$  værdier for de tre racer

$H_1$ =ikke H-W proportioner<sup>3</sup>

Race	$F_{IS}$ <sup>1</sup>	P-value <sup>2</sup>	HWE Afvigelser
Agersø-kvæg	-0,009	0,0369	4
Jysk kvæg	0,029	0,0856	4
RDM-70	0,028	0,230	1

<sup>1</sup> Weir & Cockerham estimat,  $f=F_{IS}$  (Weir & Cockerham, 1984)

<sup>2</sup> Baseret på Fisher's metode (Rousset and Raymond, 1995)

<sup>3</sup> Alternative hypotese ( $H_1$ ) ved Probability testen (Guo and Thompson, 1992)

### Populationsstruktur

Kvantitative estimater af den genetiske differentiering mellem racerne blev foretaget på baggrund af variationen i d-loopet,  $\Phi_{ST}$  og mikrosatellit allelfrekvenser,  $F_{ST}$  (tabel 5).

Tabel 5. Parvise  $\Phi_{ST}$  og  $F_{ST}$  er givet henholdsvis under og over diagonalen

	Agersø-kvæg	RDM-70	Jysk kvæg
Agersø-kvæg		0,1355*	0,1338*
RDM-70	0,37142**		0,1725*
Jysk kvæg	0,65675**	0,23655**	

\* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$

Alle racesammenligninger gav signifikante afvigelser fra nulhypotesen, således må racerne anses for at tilhøre genetisk distinkte populationer.

Det fremgår, at der er en stor forskel på de bestemte  $\Phi_{ST}$  og  $F_{ST}$  værdier. Baggrunden for forskellen kan skyldes genetisk drift eller at tyre fra de to andre racer er blevet krydset ind i Agersø-kvæget, hvorved racerne overordnet set er blevet nærmere beslægtede, hvilket medfører den lavere  $F_{ST}$  værdi. Grunden til, at den sidste mulighed ikke påvirker  $\Phi_{ST}$  værdien er, at mitochondriet er maternelt nedarvet.

De opnåede  $F_{ST}$  værdier (tabel 5) er sammenlignelige med andre forskeres resultater herunder  $F_{ST}=0,112$  mellem syv europæiske racer (MacHugh, 1998), tyve europæiske racer  $F_{ST}=0,107$  (Kantanen, 2000), tre nordøst asiatiske racer  $F_{ST}=0,109$  (Kim, 2002) og  $F_{ST}=0,154$  mellem Jersey og Holstein (Hansen, 2002)

Vi foretog endvidere en homogenitets test (Hudson, 1992) baseret på sekvensdata fra d-loopet. Denne test viste, at alle racesammenligningerne var signifikante ( $P<0,001$ ; tabel 6). Vi kan derfor på baggrund af resultaterne for de to markører slutte, at der er en struktur i vores datamateriale.

Tabel 6. Hudson homogenitets test (Hudson, 1992)

Sammenligninger	$H_{ST}$	$K_{ST}$
Agersø-kvæg - RDM-70	0,3094***	0,2257***
Agersø-kvæg - Jysk kvæg	0,5123***	0,4915***
RDM-70 - Jysk kvæg	0,2643***	0,1282***

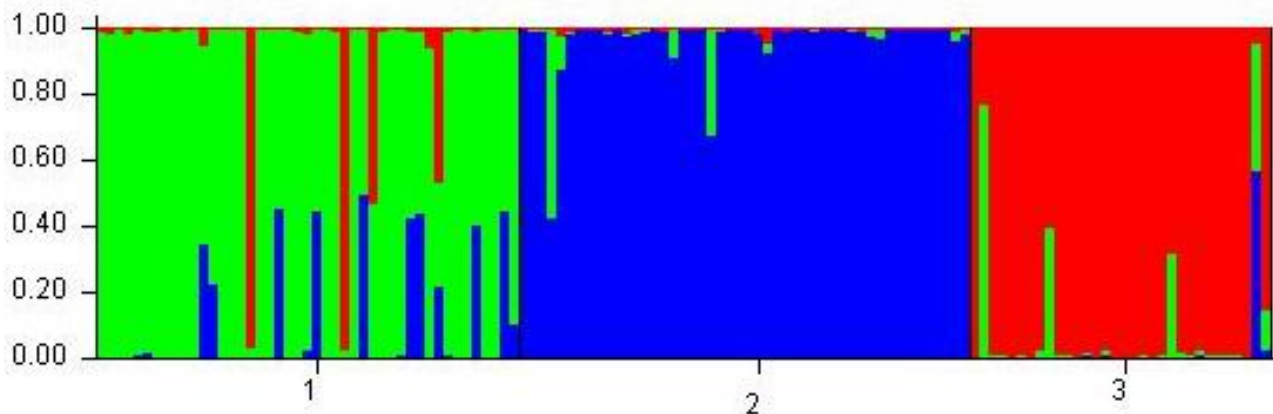
\*\*\* $P<0,001$

Analysen af den molekylære varians, AMOVA gav følgende fordeling af variationen (tabel 7)

Tabel 7. Fordelingen af variationen

	$\Phi_{ST}$	$F_{ST}$
Mellem racer	42,64%	15,50%
Mellem individer	57,36%	84,50%

Af variationen i d-loopet kan 42,64% tilskrives forskelle mellem populationer og 57,36% forskelle mellem individer. Fordelingen af variationen i mikrosatellit loci mellem racerne indikerer, at 15,5% af variationen skyldes forskelle mellem racer, mens 84,5% skyldes forskelle mellem individer. Således peger begge markører mod en overordnet differentiering (alle signifikante,  $P<0,05$ ). Den genetiske struktur i vores datamateriale blev endvidere undersøgt ved hjælp af programmet *Structure* (Pritchard, 2000). Programmet genfandt vores tre racer, og således blev den genetiske struktur bekræftet (figur 1).



Figur 1. Plot af individuelle *ancestry* sandsynligheder fra *Structure* (Se også appendiks 1)  
(Grøn= Agersø-kvæg, Blå= Jysk kvæg og Rød= RDM-70)

Det bemærkes endvidere, at den genetiske struktur ligeledes er evident i Principiel koordinat analyse (PCO) baseret på Jaccard distancen mellem individuelle AFLP genotyper (figur 3). Det fremgår her, at individer indenfor hver race er nærmere hinanden end de er med individer udenfor racen.

#### Den genetiske relation mellem racer

Vi konstruerede to *ikke-rodet* Neighbor-joining træer på baggrund af Nei's distance,  $D_A$  (Nei, 1983) og Cavalli-Sforza & Edwards Chord distance,  $D_C$  (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967). Af fænogrammerne fremgår det, at Agersø-kvæg og RDM-70 har tættere genetiske relationer end nogen af dem har til Jysk kvæg (figur 2a og 2b).

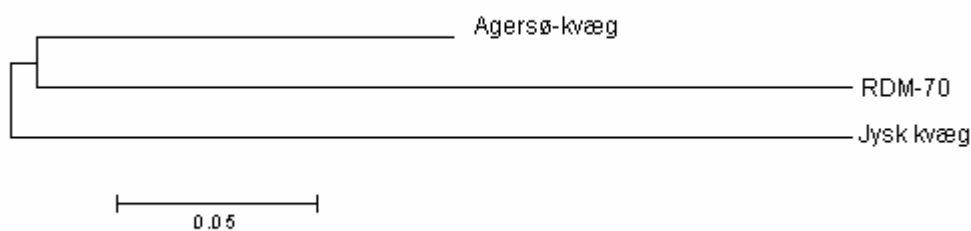


Fig.2a. Neighbor-joining dendrogram baseret på  $D_A$  (Nei, 1983)

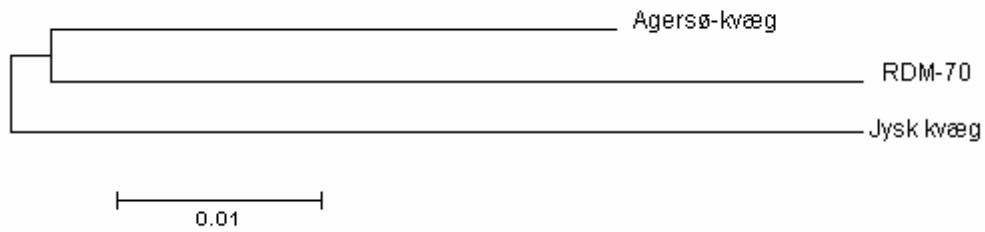
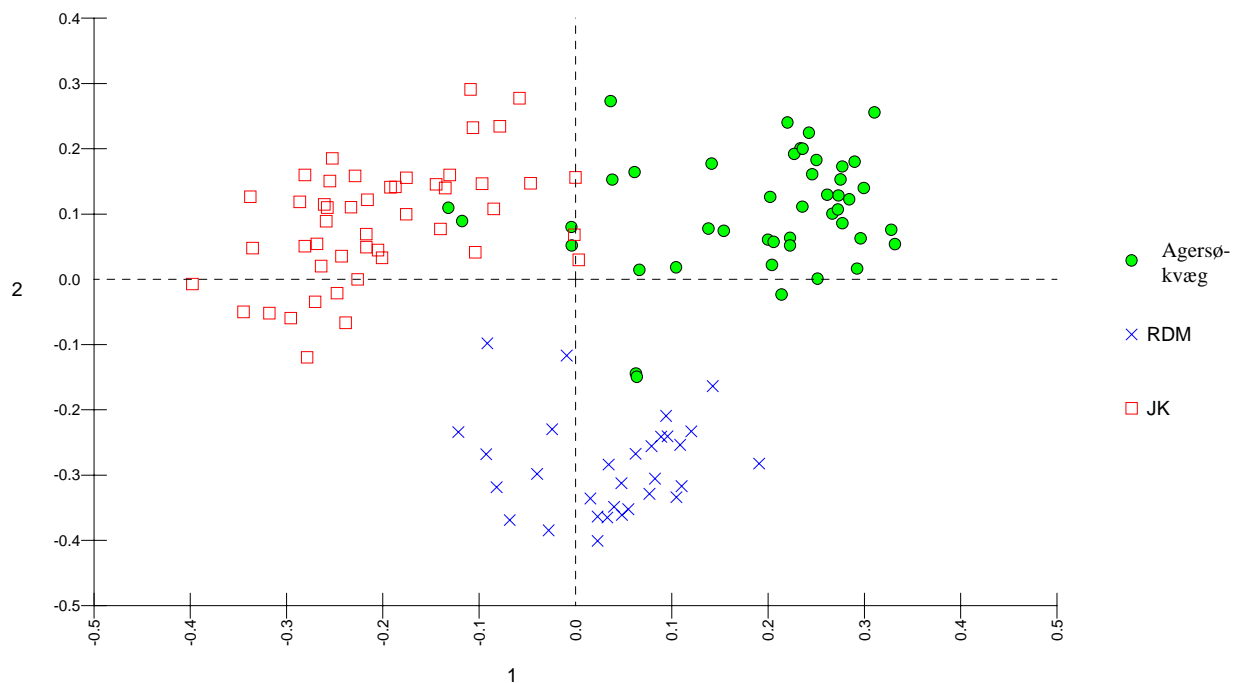


Fig.2b Neighbor-joining dendrogram baseret på  $D_C$  (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967)

Relationerne er konsistente med, hvad man forventer ifølge racernes indbyrdes historie. En anden måde at visualisere de genetiske relationer mellem individer er ved at lave en principiel koordinat analyse af Jaccards distance mellem individer baseret på AFLP data (figur 3). Dette blev foretaget og de to første variable beskrev 17,7 % af variationen (informationen), hvilket er sammenligneligt med resultater fra undersøgelser af andre kvægracer (Negrini, 2002; Ajmone-Marsan, 2002). Det fremgår af plottet, at individer indenfor hver af de tre racer er nærmere hinanden end med individer udenfor racen, dog med undtagelser af nogle Agersø-kvæg.



Figur 3. PCO baseret på Jaccard distancen

## Diskussion og konklusion

### *Den genetiske integritet af Agersø-kvæget*

Forskelle mellem racerne med hensyn til frekvensen af og forskelle mellem d-loop haplotyper blev kvantificeret ved brug af  $F_{ST}$  analogen  $\Phi_{ST}$ . Det viste sig, at alle racesammenligninger var signifikante (tabel 5). Hudsons homogenitets test blev ligeledes anvendt og både den sekvensbaseret  $K_{ST}$  og den haplotype frekvensbaseret  $H_{ST}$  viste sig at være statistisk signifikante (tabel 6). Antallet af haplotyper fordelte sig mellem Agersø-kvæget, RDM-70 og Jysk kvæg som henholdsvis 5, 10 og 4. Fordelingen af haplotyperne indenfor Agersø-kvæget og Jysk kvæg var meget ulige, således havde 34 dyr af Agersø-kvæget den samme haplotype, H1 (87 %) og 38 dyr af Jysk kvæg, H3 (83 %). Det viste sig endvidere, at Agersø-kvæget ikke havde nogen unikke haplotyper, men delte H1, H3 og H5 med Jysk kvæg og H2 og H4 med RDM-70 (appendiks 4). Resultaterne af d-loop variationen indenfor og mellem racer bekræfter, at racerne kan adskilles i tre distinkte populationer. Det store antal dyr med haplotype 1 og 5 hos henholdsvis Agersø-kvæget og Jysk kvæg indikerer, at genetisk drift har opereret i populationerne.

Strukturen blev ligeledes kvantificeret gennem estimater af  $F_{ST}$  værdier på baggrund af data fra mikrosatellit loci og viste, at alle sammenligninger mellem Agersø-kvæget, RDM-70 og Jysk kvæg ligeledes var signifikant forskellige fra nul ( $P < 0,05$ , tabel 5). Strukturen med tre adskilte racer blev ligeledes bekræftet i *Structure* (Pritchard, 2000), hvor de forskellige dyr på baggrund af deres genotype placeres i forhold til andre dyr (figur 1). I multivariansanalysen baseret på AFLP data kunne man klart se tre adskilte grupper af individer (figur 3). Individerne i grupperne svarer til individerne indenfor hver race med få undtagelser (herom senere), hvorfor denne analyse ligeledes styrke argumentet for, at de tre racer kan ses som værende genetisk adskilte.

*Den overordnede konklusion på baggrund af analyserne fra de tre markørsæt er, at Agersø-kvæget kan adskilles fra RDM-70 og Jysk kvæg.*

### *Indavl?*

Afvielser fra det forventet under antagelsen om Hardy-Weinberg proportioner kan have flere årsager, således forårsages en negativ afvigelse af overdominant selektion og udkrydsning (*outbreeding*). Positive afvielser derimod kan skyldes, at det pågældende locus er under selektion (*Genetic hitchhiking*), tilstedeværelsen af alleler, som ikke amplificeres (nul alleler), Wahlund effekten (tilstedeværelsen af en struktur indenfor racen) og/eller indavl. Vores undersøgelse viste, at Agersø-kvæget ikke er indavlet (tabel 4), hvilket sandsynligvis kan forklares med blodfornyelsen fra dyr udenfor racen (link 2).

### *Den genetiske relation mellem racerne*

*(er Agersø-kvæget rester af Ø-kvæget?)*

Vi har på baggrund af vores mikrosatellit data konstrueret ikke-rodet fænogrammer ved hjælp af Neighbor-joining metoden (Saitou & Nei, 1987) baseret på henholdsvis Nei's genetiske distance,  $D_A$  (Nei, 1983) og Chord distancen,  $D_C$  (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967). Fænogrammer grupperer taxa på baggrund af overordnede genetiske ligheder baseret på distancer. Ud fra en kladistisk betragtning afspejler denne fremgangsmåde ikke de evolutionære relationer mellem taxa, men på trods af dette refererer mange forskere til sådanne (rodet) fænogrammer, som værende en fylogeni (Kim, 2003; Mirette, 2002; Loftus, 1994; Troy, 2001; Kim, 2002; Muwanika, 2003; Maudet, 2002; Martín-Burriel, 1999; MacHugh, 1998). Af fænogrammet fremgår det, at Agersø-kvæget og RDM-70 er nærmere hinanden end de hver især er til Jysk kvæg. Dette forhold er

forventeligt, hvis man tager racernes historie i betragtning. Således vil Ø-kvæget spalte ud sammen med RDM-70, da denne race er grundlagt med gener fra Ø-kvæget. Det skal bemærkes, at et lignende resultat vil fremkomme, hvis Agersø-kvæget er grundlagt med individer fra RDM-70, man kan derfor ikke slutte entydigt, om Agersø-kvægets status, som Ø-kvæg, på baggrund af Neighbour-Joining træet.

Vi fandt fem haplotyper i vores karakteristik af d-loopet hos Agersø-kvæget (appendiks 4). Ingen af dem er racespecifikke, men deles med Jysk kvæg og RDM-70. Således deles haplotype 1, 3 og 5 med Jysk kvæg, mens haplotype 2 og 4 deles med RDM-70. På baggrund af AFLP og mikrosatellit analysen er der sået tvivl, om Agersø-kvæg nummer 499, 429, 519, 498, 430 og 523 tilhørsforhold til racen. Hvis det forholder sig sådan, at dyrene er blandet i oprindelse i stedet for at være oprindelige, så forligger muligheden, at de pågældende d-loop haplotyper er blevet ført ind i racen af individer fra de to andre racer (introgression). Hvis dette scenario er korrekt, så er der reelt set kun én Agersø-kvæg haplotype tilbage. Denne haplotype er H1, som også findes hos Jysk kvæg, men ikke hos RDM-70, således binder denne mulige oprindelige haplotype Agersø-kvæget sammen med Jysk kvæg. En anden ligeså plausibel mulighed er, at haplotype 1 er gået tabt i RDM-70 ved *lineage sorting*. Det er således vanskeligt, at konkludere om racernes fylogeni på baggrund af d-loop haplotype.

Vi vil understrege, at vores datamateriale ikke har været tilstrækkeligt informativt til at kunne fastslå Agersø-kvægets status, som værende Ø-kvæg. Det modsatte har heller *ikke* været tilfældet. Vi har dog kunne fastslå kvægets status, som hørende til en population, som er genetisk adskillig fra RDM-70 og Jysk kvæg. En måde at fastslå, om Agersø-kvæget er de sidste efterkommere af Ø-kvæget kunne ske, hvis for eksempel vi havde fundet en unik d-loop haplotype, som ikke var at finde hos de to andre racer, men som er fundet i fossilt DNA fra det oprindelige kvæg i Danmark. Denne mulighed foreligger ikke, da Agersø-kvæget ikke har en unik haplotype (tabt ved *lineage sorting*?). En anden mulighed er anvendelsen af mikrosatellit data fra fossilt DNA, således vil en genfindelse af Agersø-kvægets private alleler her, samt variationen af de øvrige alleler kunne bidrage med stærke argumenter for og imod racetilhørsforholdet. En tredje mulighed er at anvende data fra nogle af de racer, som er blevet genotyperet i to store europæiske projekter (*RESGEN* og *NEURO-CAD*). Racerne, som indgår i disse projekter er alle blevet typet for de samme 30 loci, som vores kvæg og allel størrelserne er blevet standardiserede ved hjælp af standarderne *INRA2000* og *Giessen2000*. Vi har således mulighed for at inkludere nogle af de omkring 60 racer i en analyse, som kan belyse Agersø-kvægets status, som landrace. Vi vil i vores kommende artikel bestræbe os på at besvare dette spørgsmål så præcist så muligt.

#### *Identifikation af Agersø-kvæg af blandet oprindelse*

Ved hjælp af programmet *Structure* (Pritchard, 2000), der anvender variationen i mikrosatellit allelfrekvenser, har vi identificeret 12 dyr indenfor Agersø-kvæget, hvis oprindelse i større eller mindre omfang er blandet (under 61 % Agersø-kvæg oprindelse). Vi vil præcisere dette, da det har betydning for en eventuel udvælgelse af avlsdyr.

De pågældende Agersø-kvæg er vist nedenfor med graden af oprindelse (*inferred ancestry*) angivet i procent (tabel 8, se endvidere appendiks 1).

Tabel 8. Graden af oprindelse vist i procent for 12 dyr (fra *Structure*)

	Agersø- kvæg	Jysk kvæg	RDM-70
81335-00498	2,4%	0,6%	97%
81335-00429	1,7%	0,4%	97,8%
81335-00523	32%	21,5%	46,5%
81335-00430	46,3%	0,4%	53,4%
81335-00538	49,8%	49,7%	0,5%
81335-00526	54%	45,6%	0,3%
81335-00436	54,6%	44,1%	1,3%
81335-00515	54,8%	44,8%	0,4%
81335-00532	55,0%	44,4%	0,6%
81335-00499	56,1%	42,8%	1,1%
81335-00540	59,2%	40%	0,8%
81335-00519	60,1%	34,3%	5,6%

Vi vil nu sammenholde ovenstående dyr med deres placering i forhold til de tre grupper i principiel koordinat analysen, PCO (se appendiks 2) baseret på Jaccard distancen og deres mitochondrielle d-loop haplotyper (appendiks 4). Dyr 429 og 498 er placeret i periferien af RDM-70 klyngen, og de bærer begge d-loop haplotypen , som kun findes hos RDM-70 (henholdsvis H4 og H2), hvilket er i overensstemmelse med de høje oprindelsesprocenter fra *Structure*. Dyr 523 og 430 har ligeledes d-loop haplotype 2, men ikke samme grad af beslægtetheds procent til RDM, hvilket er konsistent med placeringen tættere på Agersø klyngen. Dyr 515, 532, 526, 540, 538 og 436 bærer alle den dominerende d-loop haplotype for Agersø-kvæg (H1), men som samtidig også deles med Jysk kvæg. De har alle omtrent den samme beslægtethed procent til Jysk kvæg, og er placeret over mod klyngen af Jyske kvæg på nær dyr 515 og 532, som er midt i klyngen. Dyr 499 bærer som den eneste den haplotype 3, som dominerer i Jysk kvæg, og den har en slægtskabs procent på 42,8% til Jysk kvæg og er placeret midt mellem klyngerne for Jysk og Agersø kvæg. Dyr 519 er placeret i Agersø klyngens periferi, den bærer, som den eneste en haplotype 5, som den deler med Jysk kvæg og har endvidere en beslægtethed procent på 34,3 % til Jysk kvæg.

Det fremgår af ovenstående sammenligning mellem resultaterne fra de tre markører, at der er en overensstemmelse mellem placeringerne i multivariansanalysen i forhold til de tre raceklynger, dyrets d-loop haplotype og den procentvise beslægtethed (*admixture* el. *oprindelse*) fra *Structure*. Således støtter analysen fra de to andre markører resultatet af de 12 Agersø-kvæg, som værende af blandet oprindelse (introgression). Under udtagningen af blodprøver oplyste Stig Bazon, Oregaard, at han var i tvivl vedrørende oprindelsen af Agersø-kvæg 498, 429, 430, 436, 515 og 519. Disse dyr er blandt de tolv identificeret (tabel 8), som værende af blandet oprindelse, hvorfor tvivlen er blevet genetisk begrundet.

De øvrige 33 Agersø-kvæg er på baggrund af mikrosatellit variation blevet placeret sammen af programmet *Structure*, de er placerede i Agersø-klyngen i AFLP analysen og bærer de mitochondrielle d-loop haplotyper karakteristisk for racen.

## Taksigelser

I forbindelse med udarbejdningen af rapporten vil jeg gerne takke Lars-Erik Holm, DJF og Torkild Liboriussen, GRU, DJF for et godt samarbejde.

Familien Benzon takkes for hjælpen ved udtagning af blodprøver, samt for billedmateriale og identifikation af kvæget.

Endvidere takkes nedenstående personer for bidrag til projektet

Katayoun Moazami-Goudarzi, INRA, Frankrig

Johannes Lenstra, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht Universitet, Holland

Paolo Ajmone-Marsan, Institute of Zootechnics, Catholic University of S. Cuore  
via Emilia Parmense, 84, I-29100 Piacenza, Italy

Ingrid Olsaker, Dept. Animal Genetics, The Norwegian School of Veterinary Science, Norway

Georg Erhardt, Dept. Animal Breeding and Genetics, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany

Pam Wiener, Roslin Institute, Skotland

Hans Siegismund, Lektor

Lene R. Nielsen, Post doc.

Rikke De Neergaard, Cand.scient.

Eline D. Lorenzen, Cand.scient.

Jonas Bin Laden, Cand.scient.

Charlotte Hansen, Laboratorietekniker

Pernille Selmer Olsen, Laboratorietekniker

Pia Friis, Laboratorietekniker

Tina Brandt, Laboratorietekniker

Sylvia Mathiasen, Laboratorietekniker

Carlsen-Langes Legatstiftelse

Ellen, Christian Og Anders Petersens Fond



## Referencer

### Link til Internettet

1. <http://www.gamle-husdyrracer.dk/dyrene/oekvaeg/Artikler%5CInternational%20interesse.htm>
2. Ø-kvægets historie (Agersø-kvæget)  
<http://www.gamle-husdyrracer.dk/nyhed/2004-1kvarthal/Aggersoekvaeg-200304/Aggersoekvaeg-200304.htm>
3. Definition af begrebet landrace  
<http://biodiversity-chm.eea.eu.int/CHMIndexTerms/Glossary/L/landrace>
4. Det fynske Ø-kvæg  
<http://www.jersey.syd-fyn.dk/fkvaeg1.htm>
5. Utrecht (CadBase) listen  
<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>
6. RESGEN projektet  
<http://europa.eu.int/comm/agriculture/res/gen/118a.htm>

### Artikler

- Aaris-Sørensen**, Kim. Danmarks Forhistoriske dyreverden, 3.udgave. **1998** Gyldendal
- Ajmone-Marsan** et al. AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal genetics*. **1997**, 28: 418-426
- Ajmone-Marsan**, P.; Negrini, R.; Milanesi, E.; Bozzi, R.; Nijman, IJ; Buntjer, JB; Valentini, A.; Lenstra, JA. Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by biallelic AFLP markers. *Animal Genetics*. **2002**, 33: 280-286. ISSN: 0268-9146.
- Andersen**, Bernt Bech; Jensen, Bent; Nielsen, Arne; Christensen, Lars Gjøl & Liboriussen T. Rod Danske Malkerace - avlsmæssigt og kulturhistorisk belyst. **2003**. DJF rapport Husdyrbrug nr. 50.
- Carvajal-Carmona**, LG; Bermudez, N.; Olivera-Angel, M.; Estrada, L.; Ossa, J.; Bedoya, G.; Ruiz-Linares, A. Abundant mtDNA diversity and ancestral admixture in Colombian criollo cattle (*Bos taurus*). *Genetics*. **2003**, 165:1457–1463.
- Cavalli-Sforza**, L.L.; **Edwards**, A.W.F. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Gen.* **1967**, 19: 233-257
- Cymbron**, T.; Loftus, R. T.; Malheiro, M. I.; Bradley, D. G. Mitochondrial Sequence Variation Suggests an African Influence in Portuguese Cattle. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **1999**, 266: 597-603.

- Del Bo, L.;** Polli, M.; Longeri, M.; Ceriotti, G. ; Looft, C. ; Barre-Dirie, A.; Dolf, G. ; Zanotti, M. Genetic diversity among some cattle breeds in the alpine area. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. **2001**, *118*: 317-325
- Edwards C.J.,** Dolf G. Looft C., Loftus R.T. & Bradley D.G. Relationships between the endangered Pustertaler-Sprinzen and three related European cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci. *Animal Genetics*. **2000**, *31*:329-332
- Guldbrandtsen, B.;** Tomiuk, J.; Loeschcke, V. POPDIST, "Version 1.1.1: A Program to Calculate Population Genetic Distance and Identity Measures". *The Journal of Heredity*. **2000**, *91*(2):178-179
- Guo, S. W.;** **Thompson, E. A.** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. **1992**, *48*: 361–372.
- Holm, S..** A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian journal of Statistics*. **1979**. *6*:56-70
- Hall, T.A.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.Ser*. **1999**: *41*: 95-98.
- Hansen, C.;** Shrestha, J.N.B.; Parker, R.J.; Crow, G.H.; McAlpine, P.J.; Derr, J.N. Genetic diversity among Canadienne, Brown Swiss, Holstein and Jersey cattle of Canada based on 15 bovine microsatellite markers.*Genome*. **2002**, *45*: 897-904.
- Hanslik, S.;** Harr, B.; Brem, G.; Schlotterer, C. Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Frisian populations *Anim. Genet*. **2000**, *31*: 31-38
- Hudson, R. R.;** Boos, D. D. and N. L. Kaplan, A statistical test for detecting geographic subdivision. *Mol. Biol. Evol.***1992**, *9*:138-151
- Jaccard, P..** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Socie´te´ Vaudoise de Science Naturelle*.**1908**, *44*: 223–70.
- Kantanen, J.;** Olsaker, I.; Holm, L-E.; Lien, S.; Vilkki, J.; Brusgaard, K.; Eythorsdottir, E.; Danell, B. ; Adalsteinsson, S. Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *Journal of Heredity*. **2000**, *91*: 446-457.
- Kim, K. S.;** Yeo, J. S.; Choi, C. B. Genetic diversity of north-east asian cattle based on microsatellite data. *Animal Genetics*. **2002**, *33*: 201-204.
- Kim, K. I.;** Lee, J. H.; Lee, S. S.; Yang, Y. H. Phylogenetic Relationships of Northeast Asian Cattle to Other Cattle Populations Determined Using Mitochondrial DNA D-Loop Sequence Polymorphism. *Biochem. Genet*. **2003**, *41*, 91-98.

- Kumar, S.**, Tamura, K., Jakobsen, I.B., and Masatoshi Nei. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, *Bioinformatics*. **2001** (submitted)
- Loftus, R. T.**; MacHugh, D. E.; Bradley, D. G.; Sharp, P. M.; Cunningham, P. Evidence for Two Independent Domestications of Cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1994**, *91*: 2757-2761.
- MacHugh, D.E.**; Loftus, R.T.; Cunningham, P.; Bradley, D.G. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics*. **1998**, *29*, 333–40.
- Mannen, H.**; Tsuji, S.; Loftus, R. T.; Bradley, D. G. Mitochondrial DNA Variation and Evolution of Japanese Black Cattle (*Bos Taurus*). *Genetics*. **1998**, *150*: 1169-1175.
- Martin-Burriel, I.**; García-Moru, E.; Zaragoza, P. Genetic diversity analysis of six Spanish native cattlebreeds using microsatellites. *Animal Genetics*. **1999**, *30*: 177-182
- Mateus, J. C.**; Penedo, M. C. T.; Alves, V. C.; Ramos, M.; Rangel-Figueiredo, M. T. Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics*. **2004**, *35*: 106-113
- Maudet, C.**; Luikart, G.; Taberlet, P. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science*. **2002**, *80*:942-950.
- Miretti, M. M.**; Pereira JR., H. A.; Poli, M.A., Contel, E. P. B.; Ferro, J. A. African-Derived Mitochondria in South American Native Cattle Breeds (*Bos taurus*): Evidence of a New Taurine Mitochondrial Lineage. *The Journal of Heredity*. USA. **2002**, *93*:323-330
- Muwanika, V.B.**, S. Nyakaana, H.R. Siegismund and P. Arctander. Phylogeography and population structure of the common warthog (*Phacochoerus africanus*) inferred from variation in mitochondrial DNA sequences and microsatellite loci. *Heredity*. **2003**. *91*: 361-372
- Negrini, R.**; Milanesi, E.; Zanotti, M; Moazami-Goudarzi, K.; Rodellar, C.; Olsaker, I.; Holm, L.-E; Nijman, IJ; Lenstra, JA.; Ajmone-Marsan, P..Genetic diversity of Italian, French, Spanish and Nordic cattle breeds as assessed by AFLP markers. (The European genetic cattle diversity consortium). 28th International conference on Animals Genetics, ISAG, Göttingen, Germany, August 11-15, **2002**, D 165, 150.
- Nei, M.**, Tajima, F., and Tateno, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* **1983**. *19*: 153-170.
- Nei, M.** Molecular Evolutionary Genetics. **1987**. New York, NY, Columbia University Press.
- Nei, M.**; **Kumar, S.** Molecular evolution and phylogenetics, Oxford University Press. **2000**. ISBN 0195135849
- Ota, T.**, **1993**. DISPAN: genetic distance and phylogenetic analysis. Pennsylvania State University (<http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/ibmpc/dispan.readme> )

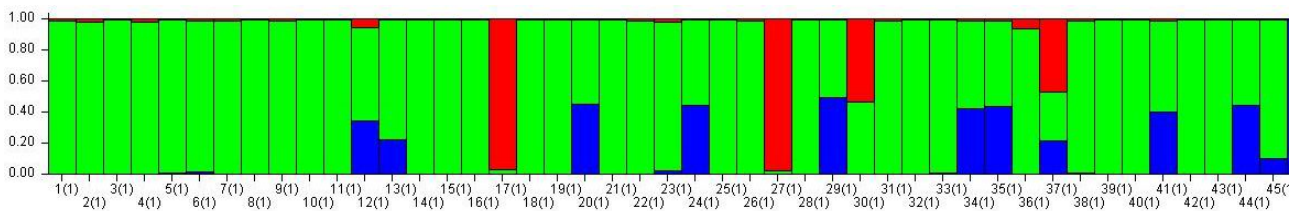
- Park, S. D. E.** Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [ Ph.D. thesis ]. **2001**. University of Dublin
- Petersen, P.H., 2001.** Kvægets avl 9.udg.,  
( [http://www.kursus.kvl.dk/shares/aha/300\\_materialer/KAforside.htm](http://www.kursus.kvl.dk/shares/aha/300_materialer/KAforside.htm) )
- Pritchard, J.K. ;Stephens, M.; Donnelly, P. J.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. **2000**, *155*: 945-959
- Raymond, M.; Rousset, F.** GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. **1995**, *86*: 248–249.
- Rendo, F.; Iriondo, M.; Jugo, B. M.; Aguirre, A.** Analysis of the Genetic Structure of Endangered Bovine Breeds from the Western Pyrenees Using Dna Microsatellite Markers, *Biochemical Genetics*. **2004**, *42* (3-4):99–108
- Rice, WR.** Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. **1989**. *43*: 223–225.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R.** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **2003**, *19*: 2496-2497
- Saitou, N.; Nei, M.** The Neighbor-Joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406-425.
- Schneider, S.; Kueffer, J.-M.; Roessli, D.; Excoffier, L.** Arlequin: a software for population genetic data analysis. **1997**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Tajima, F.** Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*. **1983**, *105*:437-460.
- Tajima, F.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. **1989**, *123*:585-595.
- Takezaki, N.; Nei, M.** Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite dna. *Genetics*. **1996**.*144*: 389–399.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*: 4673–4680.
- Vos et al.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. **1995**, *21*: 4407-4414
- Weir, B. S.; Cockerham, C. C..** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. **1984**, *38*:1358–1370.

## Appendiks 1

Oprindelse (*Inferred ancestry*) af Agersø-kvæget (*Structure*, fra figur 1)

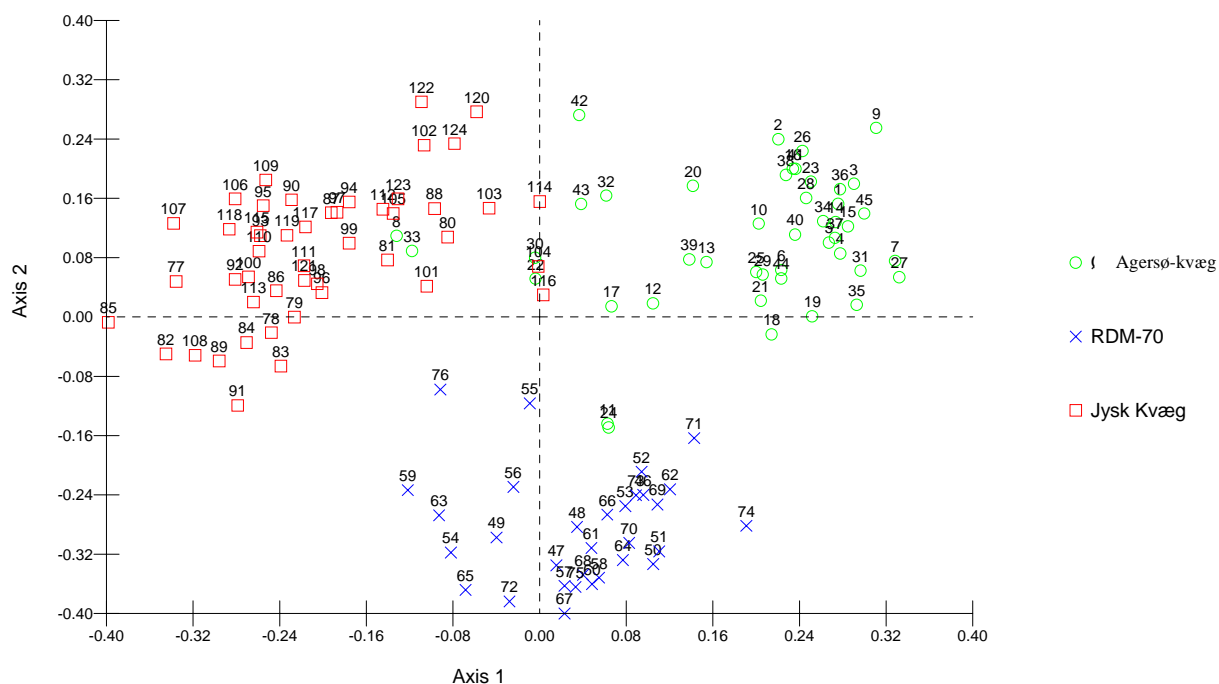
Farvekode:

Agersø-kvæget (Øk)      Grøn  
 RDM-70 (RDM)        Rød  
 Jysk kvæg (Jk)        Blå



		RDM	Øk	Jk		RDM	Øk	Jk
1	Øk83	0.010	0.984	0.007	24	Øk515	0.004	0.548 0.448
2	Øk87	0.019	0.976	0.005	25	Øk443	0.003	0.992 0.005
3	Øk15	0.004	0.994	0.002	26	Øk447	0.008	0.988 0.005
4	Øk32	0.017	0.980	0.003	27	Øk429	0.978	0.017 0.004
5	Øk142	0.006	0.981	0.014	28	Øk441	0.003	0.995 0.002
6	Øk137	0.012	0.973	0.014	29	Øk538	0.005	0.498 0.497
7	Øk99	0.011	0.982	0.007	30	Øk430	0.534	0.463 0.004
8	Øk43	0.002	0.996	0.002	31	Øk398	0.011	0.987 0.002
9	Øk37	0.013	0.985	0.002	32	Øk555	0.004	0.989 0.007
10	Øk11	0.005	0.992	0.003	33	Øk89	0.005	0.985 0.010
11	Øk475	0.002	0.996	0.002	34	Øk499	0.011	0.561 0.428
12	Øk519	0.056	0.601	0.343	35	Øk436	0.013	0.546 0.441
13	Øk444	0.003	0.769	0.228	36	Øk468	0.058	0.935 0.007
14	Øk403	0.003	0.995	0.002	37	Øk523	0.465	0.320 0.215
15	Øk381	0.003	0.994	0.003	38	Øk470	0.011	0.980 0.008
16	Øk375	0.003	0.995	0.002	39	Øk435	0.002	0.996 0.002
17	Øk498	0.970	0.024	0.006	40	Øk445	0.003	0.995 0.002
18	Øk471	0.004	0.989	0.007	41	Øk540	0.008	0.592 0.400
19	Øk143	0.004	0.994	0.002	42	Øk407	0.003	0.995 0.002
20	Øk526	0.003	0.540	0.456	43	Øk448	0.003	0.994 0.002
21	Øk442	0.004	0.994	0.003	44	Øk532	0.006	0.550 0.444
22	Øk379	0.008	0.989	0.003	45	Øk376	0.003	0.895 0.101
23	Øk474	0.019	0.959	0.021				

## Appendiks 2. PCO på Jaccards distance, AFLP data



Nummer	Dyr	Nummer	Dyr	Nummer	Dyr
1	ØK-442	22	ØK-526	43	ØK-540
2	ØK-448	23	ØK-444	44	ØK-137
3	ØK-435	24	ØK-498	45	ØK-375
4	ØK-381	25	ØK-32		
5	ØK-474	26	ØK-143		
6	ØK-468	27	ØK-443		
7	ØK-407	28	ØK-475		
8	ØK-532	29	ØK-447		
9	ØK-43	30	ØK-499		
10	ØK-11	31	ØK-555		
11	ØK-429	32	ØK-523		
12	ØK-87	33	ØK-515		
13	ØK-83	34	ØK-398		
14	ØK-142	35	ØK-89		
15	ØK-37	36	ØK-445		
16	ØK-441	37	ØK-99		
17	ØK-538	38	ØK-15		
18	ØK-403	39	ØK-376		
19	ØK-471	40	ØK-470		
20	ØK-519	41	ØK-379		

(Agersø-kvæg er her benævnt ØK)

### Appendiks 3. Racespecifikke alleler (Private alleles)

Agersø-kvæg, 9 private alleler

Bm1818	252
Hel9	161
Ilsts006	291
Ilsts006	299
Mm12	117
Haut24	120
Tgla227	81
Tgla227	95
Tgla122	154

RDM-70, 11 private alleler

Bm1818	266
Eth225	153
Inra23	201
Tgla126	125
Tgla227	99
Tgla53	159
Eth185	236
Mm12	113
Inra063	185
Inra037	134
Haut27	150

Jysk kvæg, 14 private alleler

Eth225	141
Tgla122	148
Eth10	211
Eth10	221
Sps115	250
Haut24	124
Tgla227	79
Eth185	238
Inra032	186
Mm12	123
Hel5	159
Hel5	161
Hel9	155
Hel9	169

(allelerne er angivet i basepar og korrigeret efter standarderne *INRA2000* og *Giesse2000*)

**Appendiks 4.** Haplotypefordelingen mellem 45 Agersø-kvæg, 48 Jysk kvæg & 31 RDM-70

Haplotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Race														
<b>Agersø-kvæg</b>	11, 15, 32, 43, 83, 87, 89, 99 475, 515, 526, 532, 538, 540, 474, 471, 470, 468, 448, 447, 445, 444, 443, 442, 441, 436, 435, 407, 403, 398, 381, 379, 375, 143, 142, 137, 555, 37, 376	498, 523, 430	499	429	519									
<b>RDM-70</b>		115, 365, 367, 368, 426, 496, 497, 662		104		93, 117, 428	106	366, 500, 715	627, 648	628, 719, 688, 629, 716, 641, 718, 654, 608, 612	642	694		495
<b>Jysk kvæg</b>	454, 457		57, 95, 92, 96, 51 422, 26, 40, 384, 386, 391, 453, 398, 460, 467 60, 70, 370, 371, 373, 374, 380, 382, 390, 434, 439, 440, 450, 451, 21, 23, 50, 54 393, 455, 452, 432, 424			30, 62, 383, 47, 389,433							59 394	

*DnaSP 4.0* (820 sites)