Identifikacija pasmine i autentifikacija proizvoda Crne slavonske svinje analizom DNK

Gvozdanović, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:493938

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Kristina Gvozdanović, mag.ing.agr.

IDENTIFIKACIJA PASMINE I AUTENTIFIKACIJA PROIZVODA CRNE SLAVONSKE SVINJE ANALIZOM DNK

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2017.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Kristina Gvozdanović, mag.ing.agr.

IDENTIFIKACIJA PASMINE I AUTENTIFIKACIJA PROIZVODA CRNE SLAVONSKE SVINJE ANALIZOM DNK

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2017.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Kristina Gvozdanović, mag.ing.agr.

IDENTIFIKACIJA PASMINE I AUTENTIFIKACIJA PROIZVODA CRNE SLAVONSKE SVINJE ANALIZOM DNK

- Doktorska disertacija -

Mentor: doc. dr. sc. Vladimir Margeta

Povjerenstvo za ocjenu:

1. **dr. sc. Goran Kušec, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednik**
2. **dr. sc. Vladimir Margeta, docent Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentor i član**
3. **dr. sc. Krešimir Salajpal, izvanredni profesor Agronomskog fakulteta u Zagrebu, član**
4. **dr. sc. Ivona Djurkin Kušec, docentica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član**
5. **dr. sc. Snježana Džijan, docentica Medicinskog fakulteta u Osijeku, član**

Osijek, 2017.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Kristina Gvozdanović, mag.ing.agr.

IDENTIFIKACIJA PASMINE I AUTENTIFIKACIJA PROIZVODA CRNE SLAVONSKE SVINJE ANALIZOM DNK

- Doktorska disertacija -

Mentor: doc. dr. sc. Vladimir Margeta

Javna obrana doktorske disertacije održana je 15. listopada 2015. godine pred Povjerenstvom za obranu:

1. **dr. sc. Goran Kušec, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednik**
2. **dr. sc. Vladimir Margeta, docent Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentor i član**
3. **dr. sc. Krešimir Salajpal, izvanredni profesor Agronomskog fakulteta u Zagrebu, član**
4. **dr. sc. Ivona Djurkin Kušec, docentica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član**
5. **dr. sc. Snježana Džijan, docentica Medicinskog fakulteta u Osijeku, član**

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti
Smjer: Stočarstvo

Doktorska disertacija

UDK: 636.06:636.4

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda
Grana: Stočarstvo

Identifikacija pasmine i autentifikacija proizvoda Crne slavonske svinje analizom DNK

Kristina Gvozdanović, mag.ing.agr.

Disertacija je izrađena na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: doc. dr. sc. Vladimir Margeta

Istraživanje je provedeno na 107 životinja od kojih je bilo 50 svinja crne slavonske pasmine (CS), 15 PIC hibrida, 12 pietrena (P), 10 topigsa (TP), 10 velikih jorkšira (J), 5 landrasa (L) i 5 duroka (D). Od ukupno analiziranih 100 svinja crne slavonske pasmine kod kojih smo odredili genotip *MC1R* gena odabrano je 30 životinja homozigota za crnu boju (CS), te 20 životinja heterozigota (CSX). Cilj istraživanja bio je utvrditi genetski status crne slavonske svinje pomoću seta od 26 mikrosatelitska markera te optimizirati najmanji broj mikrosatelita dovoljnih za identifikaciju pasmine te autentifikaciju proizvoda načinjenih od iste.
Prema preporuci ISAG-FAO odabran je set od 26 mikrosatelitna lokusa (S0026, S0155, S0005, Sw2410, Sw830, S0355, Sw24, Sw632, Swr1941, Sw936, S0218, S0228, Sw122, Sw857, S0097, sw240, IGF1, Sw2406, Sw72, S0226, S0090, Sw2008, Sw1067, S0101, S0178, Sw911 i S0002) grupirana u tri združene PCR reakcije. Dobiveni PCR produkti su analizirani pomoću ABI 3730XLs (Applied Biosystems).
Analizom genetske strukture populacija utvrđena je niska genetska udaljenost između CS i CSX skupina, no visoka genetska udaljenost s ostalim pasminama. Analizom frekvencije gena identificirano je 15 privatnih alela specifičnih za skupinu crnih svinja homozigota na *MC1R* genu, te 10 privatnih alela specifičnih samo za heterozigote na *MC1R* genu. Prosječan broj alela po lokusu se kretao od 2,61 do 6,54 što ukazuje na veliku genetsku raznolikost. Optimizacijom broja mikrosatelitskih lokusa temeljenom na frekvenciji alela, broju privatnih alela, vrijednosti informacijskog sadržaja polimorfizma te izračunu vjerojatnosti identiteta utvrđen je set od pet markera koji su dovoljno informativni za identifikaciju pasmine i autentifikaciju proizvoda. Koristeći navedeni set moguće je identificirati crnu slavonsku pasminu od koje su proizvedeni proizvodi napravljeni od pojedinačnih životinja (šunka ili pršut), međutim identifikacija u kobasičarskim proizvodima nije izvediva zbog većeg broja životinja korištenih pri proizvodnji ovakvih proizvoda, što za ovaj tip analize i veliku polimorfnosti mikrosatelitskih markera nije pogodno.

Broj stranica: 156
Broj slika: 44
Broj tablica/grafova: 35/17
Broj literaturnih navoda: 185
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: crna slavonska svinja, mikrosateliti, DNK, združena PCR reakcija

Datum obrane:

Povjerenstvo za obranu:
dr. sc. Goran Kušec, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednik

dr. sc. Vladimir Margeta, docent Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentor i član

dr. sc. Krešimir Salajpal, izvanredni profesor Agronomskog fakulteta Zagreb, član

dr. sc. Ivona Djurin Kušec, docentica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član

dr. sc. Snježana Džijan, docentica Medicinskog fakulteta Osijek, član

Disertacija je pohranjena u:
Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Rijeci, Sveučilište u Splitu

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

PhD thesis

Faculty of Agriculture in Osijek
Postgraduate university study: Agricultural Sciences
Course: Animal Breeding

UDK: 636.06:636.4
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Agriculture
Branch: Animal Science

Breed identification and authentication of Black Slavonian pigs by DNA analysis

Kristina Gvozdanović, M.Eng.Agr.

Thesis performed at Faculty of Agriculture in Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Supervisor: Assist. Prof. Vladimir Margeta

The study was conducted on 107 animals, of which there were 50 pigs Black Slavonian breed (CS) 15 PIC hybrids, 12 Pietrain (P), 10 Topigs (TP), 10 Large White (J), 5 Landrace (L) and 5 Duroc (D). The aim of this study was to determine the genetic status of the Black Slavonian pig with a set of 26 microsatellite markers that were grouped into 3 multiplex PCR reactions and optimize the smallest number of microsatellite markers that are sufficient for breed identification and product authentication.
Isolation of DNA from the collected samples were performed using Thermo Scientific Gene Jet Genomic DNA Purification Kit. Insulation performance was checked by electrophoresis on 1.0% agarose gel. After checking, the isolated DNA was stored at - 20°C and was subsequently used for the genotyping of microsatellite loci. According to the recommendation ISAG-FAO selected set of 26 microsatellite loci were: S0026, S0155, S0005, Sw2410, Sw830, S0355, SW24, Sw632, Swr1941, Sw936, s0218, s0228, Sw122, Sw857, S0097, sw240, IGF1, Sw2406, Sw72 , s0226, S0090, SW2008, Sw1067, S0101, S0178, S0002 and Sw911. Microsatellites are grouped into 4 combined with the reaction due to their length. In a joint response to each of three microsatellites were marked with the same colour (F-6-FAM - blue, ATTO550- yellow, H HEX green). By analysing the genetic structure of populations showed low distance between the two groups of Black Slavonian breed, but a high genetic distance to other breeds. Analysis of allele frequency was found 15 private allele specific for black pigs homozygous the MC1R gene, and 10 private alleles specific for hybrids. The average number of alleles per locus ranged from 2.61 to 6.538 indicating a great genetic diversity. The optimization of the number of microsatellite loci was based on the frequency of alleles, the number of private alleles, the value of polymorphism information content and calculation of probability of identity. The number of microsatellite loci was optimized and analysis was provided a set of five microsatellite markers that were sufficiently informative for breed identification and product authentication. With a set made of 5 microsatellite markers, it is possible to identify the breed from which are certain food products are produced, such as ham. Identification in other kind of products is not possible because such products are produced by a large number of animals witch is not suitable for this type of analysis because of high microsatellite polymorphism.

Number of pages: 156
Number of figures: 44
Number of tables/graf: 35/17
Number of references: 185
Original in: croatian

Key words: Black Slavonian pig, microsatellites, DNA, multiplex PCR

Date of the thesis defense:

Reviewers:
Prof. Dr. Goran Kušec, Faculty of Agriculture in Osijek, president

Assist. Prof. Vladimir Margeta, Faculty of Agriculture in Osijek, supervisor and member

Assoc. Prof. Krešimir Salajpal, Faculty of Agriculture Zagreb, member

Assist. Prof. Ivona Djurin Kušec, Faculty of Agriculture in Osijek, member

Assist. Prof. Snježana Džijan, Faculty of Medicine Osijek, member

Thesis deposited in:
National and University Library, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, University of Zagreb; University of Rijeka; University of Split

KAZALO

1. UVOD 1
1.1. Pregled literature 3
1.1.1. Crna slavonska svinja 3
1.1.1.1. Podrijetlo i nastanak pasmine 3
1.1.1.2. Sustav držanja 5
1.1.1.3. Proizvodna svojstva 7
1.1.1.4. Kvaliteta mesa 8
1.1.1.5. Budućnost uzgoja crne slavonske pasmine 9
1.1.2. Identifikacija crne slavonske pasmine temeljem analize MC1R gena 11
1.1.3. Postupak autentifikacije 12
1.1.3.1. DNK metode za autentifikaciju proizvoda 13
1.1.3.2. Združene PCR reakcije 16
1.1.4. Primjena molekularnih markera u postupcima autentifikacije 18
1.1.4.1. Mikrosateliti 18
1.1.4.2. Mitohondrijska DNK (mt DNK) 21
1.1.4.3. Polimorfizam jednog nukleotida 23
1.1.4.4. DNK barkodiranje 25
1.1.4.5. Mikročipovi 26
1.1.5. Razine autentifikacije 27
1.1.5.1. Autentifikacija pasmine 27
1.1.5.2. Autentifikacija vrste 28
1.1.5.3. Autentifikacija životinje 28
1.1.5.4. Autentifikacija po spolu 29

2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE 30

3. MATERIJAL I METODE RADA 31
3.1. Eksperimentalne životinje 31
3.2. Prikupljanje uzoraka 31
3.3. Izolacija DNK 32
3.3.1. Provjera izolacije 32
3.4. Analiza MC1R genotipova 32
3.5. Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa 33
3.5.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR) 33
3.5.2. Optimizacija združenih reakcija 35
3.5.2.1. Optimizacija prve združene reakcije 35
3.5.2.2. Optimizacija druge združene reakcije 37
3.5.2.3. Optimizacija treće združene reakcije 38
3.6. Statistička obrada podataka 40

4. REZULTATI I RASPRAVA 42
4.1. Analiza MC1R genotipova 42
4.2. Optimizacija združenih reakcija 42
4.3. Analiza strukture populacija 49
4.4. Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže 58
4.5. Autentifikacija proizvoda crne slavonske svinje 86
4.5.1. Autentifikacija proizvoda uz set od 9 mikrosatelitna markera 86
4.5.2. Autentifikacija proizvoda uz set od 8 mikrosatelitna markera 96
4.5.3. Autentifikacija proizvoda uz set od 5 mikrosatelitna markera 109
4.5.4. Autentifikacija proizvoda pomoću MC1R gena 115

5. ZAKLJUČCI 118

6. LITERATURA 122

7. SAŽETAK 139

8. SUMMARY 140

9. PRILOG 141

ŽIVOTOPIS 155

KAZALO TABLICA

Tablica 1. Struktura obroka pojedinih kategorija crnih slavonskih svinja (Pravilnik o radu UCSS „Fajferica“, 2014.) 6
Tablica 2. Potrebna količina hrane po grlu za različite kategorije svinja (Pravilnik o radu UCSS „Fajferica“, 2014.) 6
Tablica 3. Varijabilnost sadržaja IMF (%) u ovisnosti o pasmini svinja (Budimir i sur., 2014.) 9
Tablica 4. Prikaz brojnosti crne slavonske svinje za razbolje 2005.-2015.godine (HPA, 2016.) 10
Tablica 5. Utjecaj genotipa MC1R gena na boju dlake kod različitih pasmina svinja (Kijas i sur., 1998.) 11
Tablica 6. Tri združene PCR reakcije te sljedovi nizvodnih i uzvodnih početnica koje su bile obilježene jednom od tri fluorescentne boje:F- 6-FAM (plava); A- ATTO559 (žuta); H- HEX (zelena) 34
Tablica 7. Gradijenti temperatura pri optimizaciji prve združene reakcije 35
Tablica 8. Gradijenti temperatura pri optimizaciji druge združene reakcije 37
Tablica 9. Gradijenti temperatura pri optimizaciji treće združene reakcije 39
Tablica 10. Vrijednosti MS (bp) dviju skupina crne slavonske pasmine svinja 44
Tablica 11. Vrijednosti MS (bp) pasmina durok, veliki jorkšir i landras 46
Tablica 12. Vrijednosti MS (bp) pasmina PIC, Pietrain i Topigs 47
Tablica 13. Zbirni polimorfizmi za ispitivane pasmine svinja 58
Tablica 14. Genetska udaljenost prema Nei (1987.) 60
Tablica 15. Fiksacijski indeksi za 26 mikrosatelitna lokusa 62
Tablica 16. Frekvencije alela za 26 analiziranih lokusa po istraživanim populacijama svinja 64
Tablica 17. Privatni aleli i njihove frekvencije kod crne slavonske pasmine svinja 69
Tablica 18. Broj alela po lokusima i istraživanim pasminama svinja 71
Tablica 19. Zbirni polimorfizmi za crnu slavonsku pasminu (CS) 74
Tablica 20. Zbirni polimorfizmi za crnu slavonsku pasminu (CSX) 75
Tablica 21. Zbirni polimorfizmi za durok pasminu (D) 77
Tablica 22. Zbirni polimorfizmi za jorkšir pasminu (J) 78
Tablica 23. Zbirni polimorfizmi za landras pasminu (L) 79
Tablica 24. Zbirni polimorfizmi za PIC (PIC) 80
Tablica 25. Zbirni polimorfizmi za pietrain pasminu (P) 82
Tablica 26. Zbirni polimorfizmi za topigs (TP) 83

Tablica 27. Set od 9 mikrosatelitna markera korištenih za autenifikaciju 86
Tablica 28. Udio svinja homozigota i heterozigota u pojedinim genetskim klasterina pri K=8 uz analizu pomoću 9 mikrosatelitnih markera 92
Tablica 29. Set od 8 mikrosatelitna markera korištenih pri autentifikaciji 97
Tablica 30. Udio svinja homozigota i heterozigota u pojedinim genetskim klasterina pri K=8 uz analizu pomoću 8 mikrosatelitna markera 102
Tablica 31. Set od 5 mikrosatelitna markera korištenih pri autentifikaciji 106
Tablica 32. Izračnate FST vrijednosti za sve mikrosatelitske lokuse u 8 populacija svinja 107
Tablica 33. Očekivana MP vrijednost izražena za mikrosatelitske lokuse u ispitivanim populacijama svinja 108
Tablica 34. Mikrosateliti s najnižim vrijednostima MP unutar populacije analiziranih pasmina te unutar populacije crne slavonske pasmine 109
Tablica 35. Očekivana MP vrijednost izražena za mikrosatelitske lokuse unutar populacije crne slavonske pasmine 110

KAZALO SLIKA

Slika 1. Grof Karl Pfeiffer 3
(Izvor: Margeta, 2015.)
Slika 2. Lasasta mangulica 4
(Izvor: www.agroportal.hr)
Slika 3. Berkšir 4
(Izvor: www.en.wikipedia.org)
Slika 4. Poland kina 4
(Izvor: www.cronefarms.com)
Slika 5. Cornwall 4
(Izvor: www.finnington.co.uk)
Slika 6. Tradicijski način držanja crnih slavonskih svinja na imanju Orlovnjak 5
(Izvor: Margeta, 2015.)
Slika 7. Crna slavonska svinja 7
(Izvor: www.alfaportal.hr)
Slika 8. Mehanizam provođenja združene PCR reakcije 17
(Izvor: http://www.premierbiosoft.com)
Slika 9. mtDNA svinja 22
(Izvor: http://humupd.oxfordjournals.org/content/12/4/401.full)
Slika 10. Lokacije na kojima su prikupljeni uzorci homozigota za crnu boju po genotipu MC1R gena te križanaca 31
Slika 11. Analizirani uzorci crne slavonske svinje po *MC1R* genu 42
Slika 12. Genescan analize prve združene reakcije(CS) 43
Slika 13. Genescan analize druge združene reakcije (CS) 43
Slika 14. Genescan analize treće združene reakcije (CS) 43
Slika 15. Rezultati STRUCTURE analize, K=2 49
Slika 16. Rezultati STRUCTURE analize, K=3 50
Slika 17. Rezultati STRUCTURE analize, K=4 50
Slika 18. Rezultati STRUCTURE analize, K=5 51
Slika 19. Rezultati STRUCTURE analize, K=6 51
Slika 20. Rezultati STRUCTURE analize, K=7 52
Slika 21. Rezultati STRUCTURE analize, K=8 52
Slika 22. Grupiranje populacija svinja analizom u STRUCTURE programu 53
Slika 23. Rezultati STRUCTURE analiza vizualizirani Clumpak programskim paketom 54

Slika 24. Neukorjenjeno filogenetsko stablo konstruirano NJ metodom 61
Slika 25. UPGMA dijagram konstruiran analizom 8 pasmina svinja 61
Slika 26. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=2 87
Slika 27. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=3 88
Slika 28. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=4 88
Slika 29. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=5 89
Slika 30. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=6 89
Slika 31. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=7 90
Slika 32. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=8 91
Slika 33. Analiza strukture populacija s 9 mikrosatelitskih markera pri K=8 uz prikaz svake analizirane jedinke u populacijama 93
Slika 34. Rezultati STRUCTURE uz 9 mikrosatelitskih markera vizualizirani Clumpak programskim paketom 94
Slika 35. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=2 98
Slika 36. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=3 98
Slika 37. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=4 99
Slika 38. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=5 99
Slika 39. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=6 100
Slika 40. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=7 100
Slika 41. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=8 101
Slika 42. Analiza strukture populacija s 9 mikrosatelitskih markera pri K=8 uz prikaz svake analizirane jedinke u populacijama 103
Slika 43. Rezultati STRUCTURE uz 8 mikrosatelitskih markera vizualizirani Clumpak programskim paketom 104
Slika 44. Sekvenca *MC1R* gena eksona 1 kod pasmina svinja s različitim Extension genotipom. Obojano mjesto predstavlja polimorfno mjesto specifično za crnu slavonsku svinju koje raspoznaje NspI restrikcijska endonukleaza 116

KAZALO GRAFOVA

Graf 1. Određivanje broja genetskih klastera K temeljem Evanno metode 49

Graf 2. Klasteriranje populacija svinja uz set od 26 mikrosatelitska markera programkim paketom GenAlEx 55

Graf 3. Klasteriranje populacije crne slavonske pasmine svinja uz set od 26 mikrosatelitska markera programskim paketom GenAlEx 56

Graf 4. Faktorijalna analiza korespondencije za ispitvane pasmine svinja uz set od 26 mikrosatelitska lokusa 56

Graf 5. Faktorijalna analiza korespondencije za dvije skupine crne slavonske pasmine svinja 57

Graf 6. Sumarna analiza alela za 8 istraživanih populacija svinja 70

Graf 7. Frekvencije istraživanih alela u populacijama svinja 70

Graf 8. Određivanje broja genetskih klastera K temeljem Evanno metode (2005.) uz set od 9 mikrosatelitna markera 87

Graf 9. Faktorijalna analiza korespondencije za ispitivane pasmine svinja uz set od 8 mikrosatelitska markera 95

Graf 10. Faktorijalna analiza korespondencije za crnu slavonsku pasminu svinja uz set od 8 mikrosatelitska markera 96

Graf 11. Određivanje broja genetskih klastera K temeljem Evanno metode (2005.) uz set od 8 mikrosatelitna markera 97

Graf 12. Faktorijalna analiza korespondencije za ispitivane pasmine svinja uz set od 8 mikrosatelitska markera 105

Graf 13. Faktorijalna analiza korespondencije za crnu slavonsku pasminu svinja uz set od 8 mikrosatelitska markera 105

Graf 14. DPCA analiza istraživanih pasmina uz set od 5 mikorsatelitna markera 112

Graf 15. UPGMA analiza ispitivanih populacij uz set od 5 mikrosatelitna lokusa 112

Graf 16. Faktorijalna analiza korespondencije za 8 ispitivanih pasmina uz set od 5 mikrosatelitna markera 113

Graf 17. Faktorijalna analiza korspondencije za dvije skupine crne slavonske pasmine svinja uz set od 5 mikrosatelitna markera 114

1. UVOD

Crna slavonska svinja je autohtona pasmina svinja u Republici Hrvatskoj. Poznata je pod nazivom „fajferica“ i predstavljala je temelj svinjogojske proizvodnje do polovice 20. stoljeća. To je pasmina koja je stvorena sustavnim selekcijskim radom od četiri pasmine: lasaste mangulice, berkšira, kornvola i poland kine (Karolyi, 2010.). Ova pasmina je pogodna za kombiniranu proizvodnju tj. proizvodnju mesa i masti. Osim njezine važnosti kao izvora starih gena, značajna je i zbog stvaranja identiteta i prepoznatljivosti područja s kojeg potječe te su upravo to razlozi zbog kojih je nužno provesti postupke njezine zaštitite. Jedan od načina njezina očuvanja je i osnivanje hrvatske deoksiribonukleinske kiseline (DNK) banke u kojoj bi se skladištili uzorci s obzirom na pasminu i generaciju s ponavljanjem uzorkovanja nakon 5-6 generacija. Navedeni intervali bi omogućili provođenje genetskih analiza i utvrđivanje udaljenosti između populacija i pasmina te održavanje slijeda rijetkih alela u selekcijskim shemama (Caput i sur., 2004.). Obzirom da u Republici Hrvatskoj postoji potencijal za proizvodnjom prehrambenih proizvoda od autohtonih pasmina svinja koji bi nosili zaštitu izvornosti ili geografskog podrijetla nameće se pitanje zaštite i očuvanja navedene autohtone pasmine. Proizvodi dobiveni od mesa autohtonih pasmina predstavljaju proizvode s dodanom vrijednosti koji kao takvi postižu višu cijenu na tržištu. Upravo je to jedan od razloga patvorenja proizvoda mesom drugih pasmina. Jedan od primjera prepoznatljivog i autohtonog proizvoda je pršut proizveden od španjolske autohtone pasmine svinja, Iberijske svinje (Sforza, 2013.). Postoje tri zemljopisne indikacije prehrambenih i poljoprivrednih proizvoda, a to su oznaka izvornosti (IO), oznaka zemljopisnog podrijetla (ZOZP) i zajamčeno tradicionalni specijalitet (ZTS) (MPS, 2015.).

Jedan od najčešće korištenih markera u genetskim analizama su mikrosatelitski markeri. Pokazali su se kao dobar markerski sustav u postupcima genetske identifikacije autohtonih pasmina svinja. Mikrosatelitski markeri predstavljaju kratke ponavljajuće sekvence široko rasprostranjene po genomu čije su karakteristike visoki stupanj polimorfizma te kodominantan način nasljeđivanja. Nadalje, podložni su mutacijama koje su zastupljenije i do 1000 puta više nego u DNK introna. Često ih se naziva i nekodirajući dio DNK (Fredholm, 1993.; Archibald i sur., 1995.). Za utvrđivanje genetske raznolikosti svinja Međunarodna udruga animalne genetike (eng. The International Society of Animal Genetics - ISAG) i FAO (eng. Food and Agriculture Organization of the United Nations) preporučuju set od 30

mikrosatelitnih lokusa koji su dostupni na web stranici http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf. Primjena združenih PCR reakcija (eng. multiplex polymerase chain reaction) u genetskim istraživanjima jedan je od najboljih načina autentifikacije proizvoda. Ovaj tip reakcija je pokazao visoku osjetljivost, tj. nizak prag detekcije DNK u ispitivanom uzorku (Dalmasso i sur., 2004.).

1.1. PREGLED LITERATURE

1.1.1. Crna slavonska svinja

1.1.1.1. Podrijetlo i nastanak pasmine

Crna slavonska svinja je autohtona pasmina svinja u Republici Hrvatskoj. Nastala je u drugoj polovici 19. stoljeća na imanju grofa Pfeifera, Orlovnjak nedaleko od Osijeka. Upravo po njezinom tvorcu u narodu se često susreće naziv »fajferica«.

Slika 1. Grof Karl Pfeiffer
(Izvor: ljubaznošću Nicholasa de Pfeiffera)

Cilj planskog križanja koje je provodio grof Pfeifera bilo je stvaranje svinje koja će biti bolje mesnatosti, plodnosti i ranozrelosti. Križao je 10 nazimica lasaste mangulice i berkšir nerastova. Proizvedene svinje je svakih 10 godina križao s nerastima američke pasmine poland kine. Postupci sustavnog križanja provođeni su od 1870. godine do 1910. godine (Uremović, 1995.). Zadnje provedeno sustavno križanje bilo je dvadesetih godina prošlog stoljeća križanjem s engleskom crnom pasminom kornvol. Stvaranje pasmine je trajalo do 1920-ih godina kada je stvorena svinja željenih svojstava. Uspješnost križanja i stvaranja pasmine potvrđena je 1873. godine osvajanjem zlatne medalje na poljoprivrednom sajmu u Beču (Karolyi i sur., 2010.).

Slika 2. Lasasta mangulica
(Izvor: www.agroportal.hr)

Slika 3. Berkšir
(Izvor: www.en.wikipedia.org)

Slika 4. Poland kina
(Izvor: www.cronefarms.com)

Slika 5. Cornwall
(Izvor: www.finnington.co.uk)

Po morfološkim svojstvima crna slavonska svinja je nalik mangulici dok je po fiziološkim karakteristikama sličnija berkširu i poland kini. Najznačajnija karakteristika crne slavonske svinje je njezina crna boja dlake. Dlake su ravne i duge, a tijelo svinja prekrivaju ravnomjerno. Papci i rilo su također tamne boje. Crna slavonska svinja pripada skupini srednje velikih svinja. Visina grebena joj iznosi 65 – 70 cm. Na glavi su izražene srednje velike i poluklopave uši. Glava je srednje duga s uleknutim profilom. Mišićavi vrat je srednje širom i srednje dug. Prsni koš je dubok i širok. Tijelo i noge su relativno kratki. Sapi su široke i oborene, a butovi srednje obrasli mišićjem (HPA, 2016.). Obzirom na to da su putice mekane ova pasmina je izuzetno pogodna za uzgoj na vlažnim terenima koji prevladavaju na području istočne Hrvatske.

1.1.1.2. Sustav držanja

Nekoliko je uvjeta koji trebaju biti ispunjeni prilikom držanja crne slavonske svinje. Oni uključuju osiguravanje i održavanje površina namijenjenih za uzgoj, izgradnju kućica za prasenje, osiguravanje dobrobiti svinja te razdvajanje krmača od nerastova. Svinje je moguće uzgajati u tri sustava, a to su ekstenzivni, intenzivni i poluintenzivni. Poluintenzivni sustav držanja je tradicionalni način uzgoja crnih slavonskih svinja. Svinje se u ovakvom sustavu drže na ispustima i pašnjacima. Uzgoj u takvom sustavu temelji se na pretpostavci da svinje iskorištavaju hranu koju pronalaze na otvorenom (pašnjaci, strništa). To se prvenstveno odnosi na hranidbu pašom i žirom. Na 1 ha površine pašnjaka može se držati 15-20 krmača u ovisnosti o dostupnoj hranidbi i površini zemljišta. Pri izgradnji objekata treba koristiti prirodne materijale te podove nastirati sa steljom. Kako bi se naglasilo tradicijsko značenje crne slavonske svinje, objekte je uputno izgraditi u tradicionalnom stilu karakterističnom za područje na kojem se uzgaja.

Slika 6. Tradicijski način držanja crnih slavonskih svinja na imanju Orlovnjak
(Izvor: ljubaznošću Nicholasa de Pfeiffera)

Krmačarnik treba biti objekt poluotvorenog tipa u koji se smještaju nazimice i krmače. Njegova površina treba biti 30 m^2. Pod se nastire sa steljom. Prasilište se sastoji od obora za prasenje čija je površina 6 m x 1,5 m. Prasad se nakon odbića smješta u uzgajalište gdje boravi u skupinama. Završetak proizvodnog ciklusa predstavlja tovilište gdje prasad boravi 18 mjeseci do tjelesne težine od 130 kg do 150 kg (Margeta, 2013.). Držanje svinja na otvorenom u ekstenzivnom sustavu podrazumijeva uzgoj na pašnjačkim površinama gdje je svinjama dostupna sva potrebna hrana. Najčešće je to uzgoj koji uključuje šume hrasta lužnjaka (*Quercus robur*, L.) čiji je tradicionalni areal rasta na području Slavonije. Osnova

hranidbe u navedenom sustavu su paša i žir uz dohranu tijekom zimskih mjeseci. Iznimno pred prasenje, krmače se smješta u objekte poluzatvorenog tipa čiji su podovi nasuti slamom. Krmače i prasad u takvim objektima ostaju do odbića (Karolyi i sur., 2010a.). Hranidba crnih slavonskih svinja temelji se na hrani koju svinje pronađu boravkom na otvorenim površinama dok u ne vegetacijskom dijelu godinu dobivaju dohranu u vidu krmiva proizvedenih na vlastitom gospodarstvu. Struktura obroka pojedinih kategorija svinja prikazana je Tablicom 1.

Tablica 1. Struktura obroka pojedinih kategorija crnih slavonskih svinja (Pravilnik o radu UCSS „Fajferica“, 2014.)

Kategorija svinja	Krmače/nazimad/tovljenici	Nerastovi	Prasad
Struktura obroka	60% kukuruz	50% kukuruz	50% kukuruz
	20% ječam	20 % stočni grašak	30 % stočni grašak
	20 % stočni grašak	20 % zob	20 % ječam
		10 % ječam	

Tablica 2. Potrebna količina hrane po grlu za različite kategorije svinja (Pravilnik o radu UCSS „Fajferica“, 2014.)

Kategorija	Oblik hrane	Količina/dan, kg	Količina/godina, kg
Dojne krmače	Zrno	1,5	150
Suprasne krmače	Zrno	1,0	265
Nazimad	Zrno	0,5	135
Nerasti	Zrno	0,5	185
Tovljenici	Zrno	0,5	185
Prasad	Smjesa	0,3	13

Krmiva koja čine osnovu obroka prasadi i odraslih kategorija svinja su zelena krma (lucerna, stočni grašak, bundeve, stočna repa, stočni kelj, čičoka) te zrno i prekrupa žitarica i leguminoza (kukuruz, sirak, ječam, stočni grašak, zob). Osnovu hranidbe tovnih svinja čine kukuruz, čičoka, stočni kelj te stočna repa. Smjesa stočnog graška i ječma se sprema u sjenažu koja se koristi u temelji na zelenoj lucerni. Tablicom 2. je prikazana potrebna količina hrane po grlu za različite kategorije svinja.

1.1.1.3.Proizvodna svojstva

Slika 7. Crna slavonska svinja
(Izvor: www.alfaportal.hr)

Crna slavonska svinja je skromnih proizvodnih svojstava. Autori navode različite rezultate plodnosti koja se kreće od 5,76 do 6,89 prasadi u leglu (Uremović i sur., 2000.), 6 do 7 prasadi u leglu (Jančić, 1971.) te 7 do 8 prasadi u leglu (Hrasnica i sur., 1958.; HPA, 2016.). Prema Uremović i sur. (2000.) broj živorođene prasadi određen je s brojem prasenja, nerastom i načinom uzgoja, dok je broj odbijene prasadi uvjetovan načinom uzgoja, nerastom i sezonalnosti. Prasad se odbija u dobi od osam tjedana s postignutom tjelesnom težinom od otprilike 12 kg. Krmače su dobrih majčinskih karakteristika. Obzirom na mali broj prasadi u leglu, Uremović i sur. (2003) navode da je povećanje plodnosti moguće postići križanjem s durok pasminom. Način držanja svinja u tovu utječe na postizanje zadovoljavajućih prosječnih dnevnih prirasta, iskorištavanje hrane te brzinu porasta svinja. Tov do završne težine od 100 kg traje od 7 do 8 mjeseci, dok težinu od 170 do 200 kg mogu postići za 12 do 16 mjeseci. Utrošak hrane za kilogram prirasta u navedenim uvjetima iznosi od 4,5 kg do 5 kg. Prema Uremović i sur. (2000.) prosječni dnevni prirasti su iznosili 478 g uz završnu tjelesnu težinu od 106 kg. U ekstenzivnim uvjetima se ostvaruju nešto niži prosječni dnevni prirasti nego u intenzivnom sustavu držanja gdje se životinje dohranjuju kukuruzom. Tako su Uremović i sur. (2003.) utvrdili prirast od 640 g u intenzivnim uvjetima, dok je Hrasnica (1958.) u svom istraživanju dobio rezultat prirasta od 700 g.

Sustavom držanja i hranidbe se utječe na ostvarivanje viših prosječnih dnevnih prirasta, no to istovremeno dovodi do smanjivanja udjela mišićnog tkiva u trupovima. Crna slavonska svinja kombinirana je pasmina svinja te upravo u ovisnosti o načinu držanja ovisi i

stupanj zamašćivanja trupa te smanjivanje udjela mišićnog tkiva u trupu. Niz autora utvrdio je različiti postotak mišićnog tkiva u trupovima svinja držanih do završne težine od 110 kg; 28,51 % (Petričević i sur., 1988.), 32,59 % (Kralik i sur., 1988.), 42,95 % (Uremović i sur., 2000.) i 38,50 % (Senčić i sur., 2001.). Uspoređujući udjele masnog i mišićnog tkiva kod crne slavonske svinje i plemenitih pasmina svinja može se zaključiti da crne svinje imaju znatno viši udio masnog tkiva. S obzirom na navedeno u njihovim trupovima će biti manja iskoristivost osnovnih dijelova kao što su vrat, leđa, lopatica i butovi. Karolyi i sur. (2004.) navode da je omjer iskoristivosti osnovnih dijelova i masnog tkiva bio 32,33 % prema 26,75%. Senčić i sur. (2005.) su istraživali svojstva kvalitete mesa kod svinja čije su završne težine iznosile 130 kg te navode rezultate udjela mišićnog i masnog tkiva od 40,96 % prema 41,00 %. U navedenim istraživanjima su zabilježena znatna povećanja udjela mišićnog tkiva kod križanaca crnih slavonskih svinja s plemenitim pasminama (durok, veliki jorkšir, landras).

1.1.1.4. Kvaliteta mesa

Prema Kauffmanu i sur. (1992.) kombinacija nutritivne vrijednosti, izgleda, okusa i korisnosti za zdravlje najviše utječe na kakvoću svježeg mesa od svinja. Boja mesa, pH vrijednosti mesa, sadržaj unutarmišićne masti te sposobnost zadržavanja mesnog soka najvažnija su kvalitativna svojstva koja se uzimaju u obzir prilikom postupka selekcije svinja (Russo, 1988.; Hoffman, 1994.). Unatoč tome što crna slavonska svinja ima niska proizvodna svojstva u odnosu na plemenite pasmine, ona se odlikuje visokom kvalitetom mesa koje je pogodno za proizvodnju tradicionalnih suhomesnatih proizvoda. Boja mesa ovisi o kemijskom sastavu mesa, količini pigmenta te njegovoj distribuciji u strukturi mesa. Uspoređujući meso crnih slavonskih svinja i plemenitih pasmina može se zaključiti da crne svinje imaju više crveno i tamnije meso. Vrijednosti CIE L* (stupanj svjetline), a* (stupanj crvenosti) i b* (stupanj žutoće) izmjerene u istraživanju Margete i sur. (2016.) iznosile su: CIE L* 45,21, CIE b* 3,02 te CIE a* 9,46. Senčić i sur. (2010.) navode vrijednosti od 51,14, 18,43 i 6,04 za CIE L*, a* i b*, dok Salajpal i sur. (2007.) te Karolyi i sur. (2004.) navode CIE L* od 48,11 do 49,93 te CIE a* u rasponu od 19,27 do 20,02. U istraživanjima koje su proveli Butko i sur. (2007.) utvrđena pH_{45} vrijednosti iznosila je 6,60 dok je vrijednosti pH_{24} bila 5,70. Slično tome, Margeta i sur. (2016.) su utvrdili početnu i završnu pH vrijednost od 6,40 i 5,78. U ranijim istraživanjima (Senčić i sur., 2001.; Karolyi i sur., 2004.; Senčić i sur., 2005.) utvrđene pH_{45} i pH_{24} vrijednosti bile su unutar normalnih vrijednosti te su se kretale od

6,11 do 6,78 za pH_{45} te 5,70 do 5,87 za pH_{24}. Na sadržaj unutarmišićne masti veliki utjecaj imaju genetika, hranidba i način držanja. Sadržaj unutarmišićne masti u mesu crnih slavonskih svinja kreće se od 4 % do 8 % (Petričević i sur., 1988; Kralik i sur., 1988.) što je znatno više nego u mesu plemenitih pasmina gdje taj postotak iznosi do 2 %. (Tablica 3).

Tablica 3. Varijabilnost sadržaja IMM (%) u ovisnosti o pasmini svinja (Budimir i sur., 2014.)

Pasmina	IMM, %	Reference
Njemački Landras	1,4	Gotz i sur., 2001.
Mangulica	7,5	Hollo, 2004.
Durok	2,0	Newcom i sur., 2004.
Iberijska svinja	6,0	Daza i sur., 2006.
Pietrain	1,7	Florowski i sur., 2006.
Crna slavonska svinja	6,0	Karoly, 2006.
Poljski Landras	1,7	Orzechowska i sur., 2008.

* IMM= unutarmišićna mast

Sposobnost zadržavanja mesnog soka svojstvo je o kojem ovisi preradbena sposobnost mesa. Prema istraživanju Butko i sur. (2007.) te Senčiću i sur. (2005.) ona je iznosila od 3,98 cm^2 do 4,50 cm^2 mjerena metodom kompresije prema Grau i Hammu (1953.). Vrijednost otpuštanja vode iz mesa izmjerena metodom vrećice prema Honikelu i sur. (1988.) u istraživanju Margete i sur. (2016.) iznosila je 1,68, dok je u istraživanju Uremović i sur. (2006.) iznosila 1,60.

1.1.1.5. Budućnost uzgoja crne slavonske pasmine

Tijekom posljednjih 10 godina postupno je dolazilo do povećanja broja crnih slavonskih svinja. Taj trend je posebno izražen u posljednje dvije godine tijekom kojeg je došlo do povećanja broja krmača za više od 450 te sada iznosi 1305 jedinki, dok se broj nerastova povećao sa 120 na 191 životinju (HPA, 2016.). Početak programa očuvanja crne slavonske svinje započinje 1996. godine kada je ustanovljeno postojanje 46 krmača i 5 nerastova. Tijekom tog razdoblja ova pasmina se nalazila u fazi kritično ugrožene za opstanak. Novim Operativnim programom razvoja svinjogojske proizvodnje u RH za

razdoblje od 2014.-2020. godine predviđeno je ostvarivanje nekoliko ciljeva. U prvom planu to se odnosi na povećanje brojnosti krmača crne slavonske svinje s dosadašnjih 1000 grla na 10 000 grla te nerastova sa 191 grla na 500 grla. U konačnici bi to značilo proizvodnju od 50 000 tovljenika godišnje te dobivanje dovoljne količine sirovine za proizvodnju tradicionalnih suhomesnatih proizvoda kako bi se ostvarila konkurentnost na svjetskom tržištu. Drugi cilj se odnosi na poboljšavanje proizvodnih i klaoničkih svojstava. Prvenstveno se misli na povećavanje plodnosti te povećanje broja prasadi u leglu za jedno do dva grla te povećanje udjela mišićnog tkiva u trupu za 5 % do 10 %. Udruga uzgajivača crne slavonske svinje Slavonije, Baranje i Zapadnog Srijema „Fajferica“ krovna je organizacija uzgoja i očuvanja crne slavonske svinje.

Tablica 4. Prikaz brojnosti crne slavonske svinje za razbolje 2006.-2015.godine (HPA, 2016.)

Godina	Crna slavonska svinja	
	Krmače	Nerastovi
2015.	1305	191
2014.	1064	163
2013.	839	120
2012.	950	125
2011.	896	109
2010.	856	115
2009.	642	74
2008.	669	78
2007.	607	62
2006.	604	46

Crna slavonska svinja predstavlja dio kulturnog i tradicionalnog nasljeđa Republike Hrvatske te je kao takva sinonim prepoznatljivosti u okvirima Europske Unije. S obzirom na to da je znak njezinog prepoznavanja crna boja dlake selekcijski postupci koji se provode temelje se upravo na tom svojstvu. Crna boja dlake se nasljeđuje dominantno te se u prvoj generaciji potomaka ne može vidjeti da li je došlo do križanja s nekom drugom pasminom. Kako bi se sa sigurnošću moglo utvrditi radili se o genetski čistim pripadnicima pasmine potrebno je provesti genetski test. Upravo je potvrda o genetskoj čistoći temelj za uvođenje grla u matični registar crnih slavonskih svinja.

1.1.2. Identifikacija crne slavonske pasmine temeljem analize *MC1R* gena

Poznato je više od 300 protein kodirajućih gena koji imaju ulogu u pigmentaciji kože i dlake kod domaćih životinja (Fontanessi i Russo, 2013.). Ovisno o udjelima eumelanina i feomelanina u stanicama javlja se razlika u pigmentiranosti dlake. Glavna karakteristika crne slavonske pasmine svinja je njezina crna boja dlake koja se nasljeđuje dominantno. Upravo je to razlog fenotipske ekspresije crne boje dlake kod svinja u F1 generaciji za koje nije poznato podrijetlo, tj. jesu li eventualno nastale križanjem crne slavonske svinje s nekom drugom pasminom svinja. Melanokortinski 1 receptor (*MC1R*) pod utjecajem je extension (*E*) lokusa te ima utjecaj na pojavnost crne boje dlake kod svinja (Kijas i sur., 1998.). Njegov utjecaj se ogleda u kontroli sinteze crveno žutog feomelanina ili crnog eumelanina.

Tablica 5. Utjecaj genotipa *MC1R* gena na boju dlake kod različitih pasmina svinja (Kijas i sur., 1998.)

Pasmina	Genotip	Fenotip
Divlja svinja	E^{+}/E^{+}	divlji tip
Velika crna	E^{D1}/E^{D1}	crna
Meishan	E^{D1}/E^{D1}	crna
Jorkšir	E^{p}/E^{p}	bijela
Pietrain	E^{p}/E^{p}	bijela/crne točke
Hempšir	E^{D2}/E^{D2}	crna/bijeli pojas
Durok	*e/e*	crvena

Kijas i sur. (1998.) te Fang i sur. (2009.) su identificirali 5 alela extension lokusa: *E+* divlji tip, E^{D1} i E^{D2} aleli koji su odgovori na pojavu tamne boje dlake, E^{P} alel koji je povezan s E^{D2} alelom, a dovodi do pojave točkastog fenotipa i recesivni alel *e* koji dovodi do pojave crvenog fenotipa. Crna boja dlake kod svinja posljedica je mutacije koja se dogodila na extension lokusu. Ona je posljedica mutacija koje se javljaju na alelima E^{D1} (L102P) i E^{D2} (D124N). U istraživanju koje je proveo Margeta (2013.) razvijena je jednostavna PCR-RFLP metoda kojom se temeljem analize gena za crnu boju dlake, *MC1R*, može potvrditi genetski status crnih slavonskih svinja.

1.1.3. Postupak autentifikacije

Proizvodnja mesa i mesnih proizvoda u svijetu do 2030. godine bi mogla doseći brojku od 376 miliona tona (Alexandratos i Bruinsma, 2012.). Prehrambeni proizvodi često puta na deklaracijama nemaju istaknut točan sastav, misleći pritom na dodane sastojke kojima se želi povećati količina proizvedenog što može dovesti do smanjivanja kvalitete samog proizvoda. Svijest ljudi o proizvodnji i konzumaciji sigurne i kvalitetne hrane posebno je došla do izražaja nakon izbijanja krize tijekom 2013. godine kada je ustanovljeno da se u proizvode dobivene od goveđeg mesa dodavalo i meso od konja. Nadalje, pojavom ptičje gripe, slinavke i goveđe spongiformne encefalopatije sve se više poteže pitanje biosigurnosti i sigurnosti hrane (Dai i sur., 2015.). Povećao se interes za provođenjem postupka autentifikacije proizvoda dobivenih od različitih vrsta domaćih životinja.

Ime pasmine često puta služi i kao ime određenog brenda što je od važnosti za proizvođače zbog prepoznavanja proizvoda od strane potrošača (Fernandez i sur., 2004.). Identifikacija različitih vrsta u mesnim prerađevinama temelj je provođenja postupka autentifikacije proizvoda (Ballin, 2010.). Mogućnost autentifikacije proizvoda ključni je čimbenik zaštite proizvoda te razdvajanja tradicionalnih od patvorenih proizvoda. Razlozi zbog kojih se određeni proizvod štiti su stvaranje identiteta, postizanje više cijene na tržištu, osnivanje udruženja proizvođača (zadruge, udruge) te povezanost proizvoda i zemljopisnog područja što izravno ima utjecaj na razvoj navedenog područja (NN br.65/15.). Dodavanje nedozvoljenih supstanci u proizvod često puta dovodi do smanjivanja prehrambene vrijednosti tog proizvoda bez utjecaja na smanjivanje tržišne vrijednosti proizvoda (Sforza, 2013.). Autohtone pasmine svinja su pod posebnom prismotrom, a razvoj molekularnih metoda ide u smjeru razvijanja bržih i jednostavnijih metoda za utvrđivanje njihovog podrijetla te mogućnost zaštite proizvoda dobivenih od takvih svinja.

Metode autentifikacije dijele se s obzirom na podrijetlo mesa, procese prerade mesa, dodatak sastojaka koji nisu animalnog podrijetla te proces zamjene mesa drugim sastojcima. Nekoliko je potkategorija koje se temelje na utvrđivanju podrijetla mesa (spol, pasmina, dob pri klanju, zemljopisno područje uzgoja te sustav uzgoja), prerade mesa (svježe i zamrzavano meso), dodatka ne mesnih sastojaka (aditivi i voda) te zamjene mesa s drugim sastojcima (masti, proteini i meso drugih životinjskih vrsta) (Ballin, 2010.).

1.1.3.1. DNK metode za autentifikaciju proizvoda

Konvencionalni sustavi autentifikacije i sljedivosti prate određeni proizvod od farme do krajnjeg potrošača. U takvim sustavima životinje i njihovi proizvodi prate se od proizvođača do klaonice, prerade, pakirnice te do krajnjeg potrošača. Obzirom na veliki broj koraka koji slijede neki proizvod postoji i velika mogućnost pogreške, a to u sustavu koji zahtjeva veliku točnost nije prihvatljivo. Ranije metode analize hrane temeljile su se na ocjeni organoleptičkih svojstava. Patvorenosti proizvoda se utvrđivala vrlo jednostavnim metodama. Tako je primjerice identifikacija stranih supstanci izvođena pomoću mikroskopa i analitičkih vagi (van Raamsdonk i sur., 2007.). Ali i sur. (2012.) navode da primjena takvih mikroskopskih metoda nije bila dovoljno pouzdana i učinkovita da bi se mogla koristiti za određivanje podrijetla pojedinih sastojaka u uzorcima.

Razvoj i uvođenje sustava autentifikacije koji se temelje na analizi DNK imaju potencijal za zamjenu konvencionalnih sustava novo razvijenima. Prednosti provođenja metoda analize DNK u procesu autentifikacije proizvoda su potreba za malom količinom tkiva ili uzorka u analiziranom proizvodu, jednostavna izolacija DNK iz uzorka i postojanje jedinstvene DNK sekvence za svaku pojedinu vrstu i pasminu. Primjena sustava autentifikacije ovisi o razini informativnosti i odgovorima koji se žele dobiti prilikom analize. Sustavi analize temelje se na analizi endogene DNK, no noviji načini analize odnose se i na analizu egzogene DNK (Fontanesi, 2009.). Tri su osnovna načina analize DNK koji se primjenjuju u autentifikaciji proizvoda. Prvo su metode umnažanja koje se temelje na provođenju lančane reakcije polimerazom (eng. Polymerase chain reaction, PCR) koju zatim slijede gel elektroforeza i hibridizacija sa specifičnim sondama. Metoda kojoj je temelj detektiranje pojedinih dijelova DNK specifičnim sondama može značajno pojednostaviti izvođenje postupka analize zbog toga što se postupak amplifikacije DNK izostavlja. Posljednji način analize odnosi se na sekvenciranje DNK čiji su troškovi izvođenja tijekom zadnjeg desetljeća znatno smanjeni, a količina informacija koje se mogu dobiti su znatno povećane (Sforza, 2013.). Metode autentifikacije temeljene na analizi proteina kao što su kromatografija i spektroskopija, pokazale su se korisnima za identifikaciju uzoraka mesa te utvrđivanje različitih vrsta u uzorcima. Metode čije je izvođenje temeljeno na analizi proteina i masti su manje učinkovite obzirom na to da se ciljani biomarkeri mogu promijeniti tijekom izvođenja procesa analize (Ali i sur., 2012.a; Ali i sur., 2014.). Ayaz i sur. (2006.) navode da su nedostaci takve metode analize priroda proteina i njihova denaturacija tijekom izvođenja postupka, a osim toga imunopretrage koje se temelje na korištenju antitijela protiv specifičnih

proteina često puta budu suprimirane djelovanjem unakrsnih reakcija koje su posljedica srodnosti vrsta. Primjena molekularno genetskih metoda puno je preciznija i jednostavnija prvenstveno zbog toga što se DNK nalazi u svim tkivima te stoga nije potreban standard za izvođenje postupka (Fajardo i sur., 2010.). Korištenje ribonukleinske kiseline (RNK) u ovakvim analizama nije preporučljiv zbog nestabilnosti molekule. U postupcima autentifikacije proizvoda koriste se sljedeći molekularni markeri: mitohondrijska DNK (mtDNK) (Murugaiah i sur., 2015.; Ni'mah i sur., 2016.), mikrosatelitski markeri (Fontanesi i sur., 2014.; Fontanesi i sur., 2016.), polimorfizam jednog nukleotida (SNP) (Corrado, 2016.) i polimorfizam različite dužine fragmenata (RFLP) (Kumar i sur., 2014.). Izvođenje PCR metode najjednostavniji je način utvrđivanja prisutnosti sastojaka različitog podrijetla u uzorcima mesnih prerađevina. To je metoda koja se temelji na hibridizaciji i sintezi specifičnih oligonukleotida i ciljane DNK. Daljnja provjera dobivenih PCR produkata može biti u vidu sekvenciranja PCR produkata, simultanog umnažanja više fragmenata s različitim probama (multiplex PCR), analize polimorfizma dužine jednog fragmenta (PCR-RFLP), DNK čipova, PCR specifičnog za vrstu i analize slučajno umnoženog polimorfnog fragmenta (PCR-RAPD) (Iwobi i sur., 2011.; Sumathi i sur., 2015.; Veselenak i sur., 2015.).

Osnova korištenja PCR-RAPD metode je korištenje jedne početnice koja može pokrenuti i aktivirati reakciju elongacije umnoženih fragmenata te dati jedinstvene otiske specifične za pojedinu vrstu koju zatim slijedi razdvajanje fragmenata i njihova izolacija. S obzirom na to da nije potrebno sekvenciranje ili hibridizacija, metoda je jednostavna i jeftina. Osim toga, za identifikaciju genetske varijabilnosti nije potrebno poznavati sekvencu analizirane DNK (Wu i sur., 2006.). Prva istraživanja pomoću ove metode proveli su Lee i Chang (1994.) gdje su identificirali meso svinje, goveda, ovce, zeca, patke i pileta pomoću početnice od 10 nukleotida. Rastogi i sur. (2007.) su za identifikaciju mesa svinje, goveda, ovce i kokoši koristili gen za NADH dehidrogenazu podjedinicu 4 te gen za mitohondrijsku 16s rRNK.

PCR-RLFP metoda temelji se na umnažanju DNK fragmenata različitih sekvenci koju zatim slijedi digestija s restrikcijskim enzimom omogućujući na taj način diferencijaciju vrsta koje su uključene u istraživanje. Pfeiffer i sur. (2004.) navode da je metoda jednostavnija i jeftinija u odnosu na druge PCR metode. Nedostatak metode je u nemogućnosti njezinog izvođenja u slučaju identifikacije vrsta iz većih uzoraka koji sadrže puno različitih životinjskih vrsta. Osim toga, metoda nije primjenjiva ni u slučaju analize uzorka koji je prethodno bio pod utjecajem topline zbog degradacije DNK (Girish i sur., 2007.). Većina istraživanja koja su izvođena pomoću ove metode analize temeljila su se na mitohondrijskom

citokromu b te genima za 12S rRNK. Kumar i sur. (2012.) te Dooshi i sur. (2014.) su pomoću PCR-RFLP metode analizirali gen za mitohondrijski citokrom b s ciljem identifikacije različitih vrsta domaćih životinja (ovca, govedo, svinja, pile, konj i magarac) u mesu i mesnim prerađevinama. Hossain i sur. (2016.) su pomoću združene PCR-RFLP metode identificirali meso svinja, ovce i bivola u uzorcima mesnih prerađevina. Metoda se temeljila na analizi gena za mitohondrijski citokrom b te gen za NADH dehidrogenazu- podjedinicu 5 (*ND5*).

Primjena PCR metode uz početnice specifične za vrstu je osjetljiva i točna metoda koja se primjenjuje za identifikaciju različitih vrsta sisavaca i ptičjih vrsta u uzorcima mesa i mesnih proizvoda. Za primjenu ove metode potrebno JE poznavanje sekvence gena kako bi se mogla dizajnirati potrebna početnica. Spomenutom metodom je moguće identificirati specifične vrste u velikom broju uzoraka bez potrebe sekvenciranja ili digestije produkata pomoću restrikcijskih endonukleaza (Rojas i sur., 2009.; Spychaj i sur., 2016.). Cilj istraživanja koje su proveli Barakat i sur. (2014.) bio je identificirati i kvantificirati svinjsko meso u halal proizvodima. Istraživanje je provedeno umnažanjem D-loop regije i mitohondrijskog citokroma b pomoću QIAxcel kapilarne elektroforeze. Navedena metoda je osjetljiva i specifična za detekciju uzoraka isključivo od svinjskog mesa. Karabasanavar i sur. (2014.) u svom su istraživanju dizajnirali početnice specifične za vrstu temeljem mitohondrijske D-loop regije svinja. Produkt amplifikacije bio je fragment dužine 712 baznih parova pomoću kojeg je moguće detektirati različite vrste životinja (sisavci, ptice, ribe) u uzorcima svinjskog mesa. Osim toga, primjenom ove metode moguće je identificirati uzorke svinjskog mesa u različitim uvjetima proizvodnje što olakšava autentifikaciju gotovih proizvoda od svinjskog mesa.

Kvantitativni PCR (qPCR) je tehnika s primjenom u analizi ekspresije gena, identifikaciji i kvantifikaciji genetski modificiranih organizama, identifikaciji mikroorganizama te autentifikaciji prehrambenih proizvoda. Primjena qPCR omogućava detekciju vrlo malih količina određene životinjske vrste u uzorku mesa. Na ovaj način se određuje kvantitativna ekspresija gena putem signala koji su rezultat djelovanja fluorescentnih signala. Fluorescentni signali omogućavaju praćenje PCR produkata iz svakog kruga reakcije, a ovise o fluorescentnoj gustoći. Kemijska metoda koja se temelji na fluorescentnoj detekciji produkata qPCR reakcije je tehnika pomoću TaqMan® sondi (Koppel i sur., 2011.). Jonker i sur. (2008.) su razvili brzu TaqMan® PCR metodu kojom su detektirali različite vrste u uzorku mesa. Metoda se temeljila na analizi mitohondrijskog citokroma b. U analiziranim uzorcima mesa koji su se sastojali mesa različitih vrsta domaćih životinja (svinja, govedo,

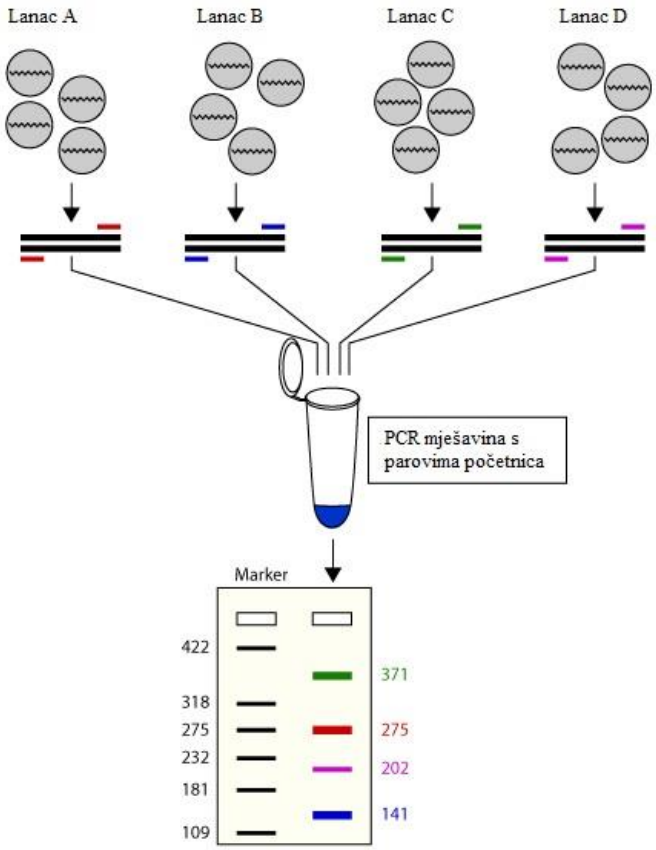
piletina, puretina, ovčetina) razina detekcije je iznosila 0,05 %, a povećavanjem broja ciklusa nivo detekcije se smanjio do 0,01 %. U istraživanju koje su proveli Kesmen i sur. (2009.) dizajnirana je specifična TaqMan® početnica temeljena na svinjskom *ND5* genu, magarećem genu za NADH dehidrogenazu podjedinicu 2 (*ND2)* i ATP genu od konja, a s ciljem određivanja i kvantifikacije navedenih vrsta mesa u sirovim i kuhanim proizvodima. Analizom je detektirano 0,0001 ng DNK u uzorcima mesa koji su sadržavali meso analiziranih životinja. Istraživanje temeljeno na mitohondrijskoj D-loop regiji pomoću TaqMan® qPCR proveli su Kim i sur. (2016.). Cilj istraživanja bio je analizirati sadržaj svinjskog mesa iz 22 uzoraka mesnih prerađevina. Razina detekcije bila je 0,1 ng toplinski obrađenog svinjskog mesa te 0,1 % u mješavinama svinjskog mesa s goveđim mesom i pilećim mesom. Razvijena metoda se pokazala visoko specifična i osjetljiva za detekciju svinjskog mesa. Soares i sur. (2013.) su u svom istraživanju koristili metodologiju qPCR-a sa Syber green bojom s ciljem kvantificiranja svinjskog mesa u gotovim proizvodima. Za razvoj metode su korištene mješavine svinjskog mesa i pilićeg mesa. Nivo detekcije qPCR analizom iznosio je 0,1 %.

PCR sekvenciranje prethodno umnoženih fragmenata rezultira dobivanjem većeg broja informacija. Ono uključuje dio mitohondrijskog genoma koji se zatim uspoređuje s prethodno poznatom sekvencom dostupnom u banki gena (Gene Bank, NCBI) (Farag i sur., 2015.). Mitohondrijski geni koji se najčešće koriste za analizu i identifikaciju vrsta su citokrom b, 12S Rrnk i 16S rRNK. Osim toga, često se koriste i geni za 18S rRNK, tumor supresor gen p53 i gen za diglicerid-aciltransferazu (Venkatachalapathy i sur., 2008.). Ukoliko je produkt sekvenciran, nije potrebna daljnja analiza s enzimima ili analiza dobivenih podataka (Karlsson i Holmlund, 2007.).

1.1.3.2. Združena PCR reakcija

Združenu PCR reakciju prvi je razvio i opisao Chamberlain i sur. (1988.). Predstavlja metodu koja se temelji na izvođenju PCR reakcije u kojoj je moguće umnožiti više ciljajućih sekvenci pomoću jednog ili više parova početnica u istoj reakcijskoj smjesi. Primjena združenih PCR reakcije je višestruka te se primjenjuje u području autentifikacije proizvoda podrijetlom od mesa različitih vrsta i pasmina domaćih životinja (Dalmasso i sur., 2004.; Hou i sur., 2015.; Ali i sur., 2015.), analize genetskih mutacija (Bourgon i sur., 2014.), identifikacije virusa, bakterija i parazita (Petri i sur., 2013.; Gadsby i sur., 2015.) te različitih kvantitativnih analizi (Taly i sur., 2013.). Prednosti korištenja združenih PCR reakcija su

mogućnost kontrole uspješnosti reakcije s obzirom na to da se prilikom analize za svaki produkt amplifikacije radi kontrola umnoženog fragmenta. Nadalje, smanjivanje troškova analize se smanjuje zbog manje količine potrebnog reagensa i vremena potrebnog za pripremu uzorka. Kvalitetu uzorka je lakše provjeriti pomoću združene PCR reakcije nego što je to slučaj sa standardnom PCR reakcijom.



Slika 8. Mehanizam provođenja združene PCR reakcije
(Izvor: http://www.premierbiosoft.com)

Prilikom izvođenja združene PCR reakcije postoji više od jedne početnice u reakcijskoj smjesi te je veća vjerojatnost stvaranja lažnih produkata koji otežavaju optimizaciju ovog tipa PCR reakcija. Nadalje, omjer početnica i uzorka koji se analizira treba biti u dobrom omjeru. Ukoliko je omjer previsok, doći će do stvaranja primer-dimera što otežava provođenje analize (Markoulatos i sur., 2002.).

Dalmasso i sur. (2004.) su razvili metodu združene PCR reakcije kojom bi se analizirali uzorci hrane. Početnice su dizajnirane iz različitih regija mtDNK (12S rRNK, $tRNK_{Val}$ i 16S rRNK) nakon poravnavanja sekvenci iz GenBank baze. Početnice su bile različitih dužina 104-106 bp za preživače, 183 bp za perad, 220-230 bp za ribe te 290 bp za

svinjsko meso. Razina detekcije iznosila je 0,004 % za ribe te 0,002 % za preživače, perad i svinje. Metoda se pokazala osjetljivom s niskim pragom detekcije. Autori su zaključili da se korištenje združene PCR reakcije može smatrati uspješnom metodom za identifikaciju različitih životinjskih vrsta u uzorcima hrane.

Chen i sur. (2014.) su primjenom združene PCR reakcije identificirali DNK podrijetlom od svinja, pataka i pilića u mesnim prerađevinama. Pripremljene mješavine su sadržavale različiti postotak jedne od tri vrste domaćih životinja (0,1 %, 1 %, 5 %, 10 % i 20 %). Rezultati su ukazali da je metoda osjetljiva te da se već kod dodatka 1 % stranog materijala može detektirati strana DNK. Ali i sur. (2015.) pokazali da je metoda združene PCR reakcije dobar alat za identifikaciju mesa podrijetlom od svinja u mesnim proizvodima. Dizajnirano je 5 parova početnica koje ciljaju *ND5* gen, gene za citokrom b te gen za ATPazu kako bi se mogli umnožiti fragmenti DNK od mačke, psa, majmuna, svinje te štakora. Nivo detekcije je iznosio 0,01 - 0,02 ng DNK u svježem mesu te 1 % stranog DNK u mesnim mješavinama. Test osjetljivosti je proveden dodatkom 10 ng, 5 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,2 ng, 0,1 ng, 0,05 ng, 0,02 ng i 0,01 ng stranog DNK uzorcima mesa poznatog sastava. Rezultati su ukazali da je razina detekcije DNK podrijetlom od svinja i mačaka 0,02 ng dok za DNK od pasa, majmuna te štakora razina detekcije iznosi 0,01 ng. Hossain i sur. (2017.) su u svom istraživanju opisali metodu dvostrukog identificiranja gena za amplifikaciju fragmenata analiziranih u združenoj PCR reakciji. Analiza je provedena na goveđim, bivoljim i svinjskim uzorcima. Detekcija više uzoraka u jednoj analizi smanjuje troškove provođenja analize te vrijeme potrebno za analizu. Analiziran je gen za mitohondrijski citokrom b te *ND5* gen kod goveda, bivola te svinja i to u uzorcima sirovog, kuhanog, autoklaviranog i mikrovalno kuhanog mesa u različitim mješavinama. Razina detekcije je iznosila 0,02 ng DNK kod čistih uzoraka te 0,1 % u binarnim smjesama i proizvodima od mesa.

1.1.4. Primjena molekularnih markera u postupcima autentifikacije

1.1.4.1. Mikrosateliti

Mikrosateliti su molekularni markeri koji predstavljaju kratke sekvence do 6 nukleotidnih ponavljanja. Često ih se još zove i jednostavne ponavljajuće sekvence (eng. Simple Sequence Repeats, SSRs), varijabilni broj tandemskih ponavljanja (eng. Variable Number Tandem Reapeats, VNTR) ili kratka tandemska ponavljanja (eng. Short Tandem Repeats, STRs). Osnovne karakteristike mikrosatelita su kodominantan način nasljeđivanja,

visoka zastupljenost po genomu te visoki stupanj polimorfizma. Jedna od njihovih karakteristika je i visoki stupanj mutacija koji je u odnosu na DNK introna i do 1000 puta veći (Crooijmans i sur., 2008.; Duran i sur., 2009.). Iako postoji veliki broj dostupnih markerskih sustava koje je moguće koristiti za genetske analize, mikrosateliti se koriste za genetske analize unutar i između populacija, za izrađivanje genskih karti, za identifikaciju životinja te za rekonstruiranje filogenetskih odnosa populacija. U usporedbi s novijom metodom analize genoma npr. korištenjem SNP-ova, primjena mikrosatelita i dalje predstavlja zlatni standard. Razlog leži u činjenicama da se pri analizi izostavljaju SNP-ovi s frekvencijom alela manjom od 5% te u visokoj cijeni koštanja genotipiziranja (Garner i sur., 2016.). Za utvrđivanje genetske raznolikosti svinja preporučen je set od 30 mikrosatelita (ISAG/FAO, 2011.). Mikrosateliti se često koriste kao markeri u genetskim istraživanjima autohtonih pasmina; europskih (Cortés i sur., 2016.; Fernández i sur., 2016.), kineskih (Ai i sur., 2013.; Du i sur., 2015.), afričkih (Ayizanga i sur., 2016.) i američkih (Pardo, i sur., 2015.).

Metode analize DNK, odnosno primjena mikrosatelita kao molekularnih markera, sve je zastupljenija u području određivanja sljedivosti i autentifikacije proizvoda. Problem ovakvih analiza je smanjenje broja mikrosatelita i potrebnih analiza na najmanji broj kojim bi bilo moguće odrediti podrijetlo proizvoda, odnosno optimizirati mikrosatelitske markere i analizu svesti na jednu združenu reakciju u kojoj bi se nalazio set mikrosatelita dovoljan za identifikaciju pasmine. Istraživanje koje su proveli Dalvit i sur. (2008.) imalo je za cilj ocijeniti i testirati 12 mikrosatelita koji bi predstavljali alat određivanja sljedivosti šest pasmina goveda. Panel mikrosatelita se određuje s obzirom na njihovu varijabilnost unutar i između populacija. Za provođenje istraživanja nužno je bilo temeljem genetske varijabilnosti i polimorfizma molekularnih markera izabrati set mikrosatelita te poznavati varijabilnost unutar populacije. Rezultati istraživanja su ukazali da je set od 8 mikrosatelitna markera dovoljan broj markera za identifikaciju istraživanih pasmina goveda. Orru i sur. (2006.) su proveli istraživanje u kojem su koristili set od 13 mikrosatelitskih markera za identifikaciju 4 pasmine goveda. Autori su predložili metodu koja se temelji na procjeni razlika u frekvenciji i broju fiksiranih alela na određenim lokusima koji su karakteristični za pasminu. Nejednaka distribucija alela između pasmina rezultira razlikama u frekvenciji istog lokusa između pasmina. Rezultat primjene predložene metode je određivanje mikrosatelita koji se mogu kombinirati u združenim PCR reakcijama te na taj način omogućiti provođenje identifikacije pasmine i u konačnici autentifikacije proizvoda.

Oh i sur. (2014.) koristili su mikrosatelitske markere za autentifikaciju mesa kineskih crnih pasmina svinja. Istraživanje je provedeno na pasminama Jeju svinje i Berkširu, a s

ciljem ispitivanja učinkovitosti mikrosatelita za identifikaciju dvije crne pasmine svinja. Autori su u radu koristili set od 13 mikrosatelitnih markera. Rezultati istraživanja pokazali su da je 10 od odabranih 13 mikrosatelita dovoljno informativno za razlikovanje dvije pasmine svinja. Scali i sur. (2015.) su u svom istraživanju istražili sustav genetske sljedivosti mesa i mesnih prerađevina dobivenih od talijanske autohtone pasmine svinja, Cinta Sense. Istraživanje je provedeno pomoću seta od 8 mikrosatelitnih markera koji su izabrani s obzirom na njihovu zastupljenost u genomu i informativnost. Nakon provedene genotipizacije i statističke analize te određivana vjerojatnosti identiteta, autori su zaključili da granica detekcije mesa Cinta Sense u proizvodima iznosi 5 %. Analizom dendograma sličnosti uzoraka mesa pasmine Cinta Sense, identificiran je genotip tipičan samo za Cinta Sense pasminu što je bila osnova razlikovanja od ostalih pasmina svinja te križanaca. Nadalje, primjena kvalitativne PCR metode u provedenim analizama može poslužiti kao metoda za identifikaciju proizvoda dobivenih od Cinta Sense s ciljem ostvarivanja zaštite izvornosti i geografskog podrijetla.

Ollivier i sur. (2005.) proveli su istraživanje kojim je bilo obuhvaćeno 68 europskih pasmina svinja od čega je bilo 29 predstavnika lokalnih pasmina svinja, 21 hibridna pasmina, 18 konvencionalnih pasmina, kineska Meishan pasmina te europska divlja svinja. Za istraživanje je korišten set od 50 mikrosatelita na prosječno 46 životinja po pasmini. Rezultati istraživanja su ukazali na 56 % genetsku varijabilnost unutar pasmina, dok su se vrijednosti genetske varijabilnosti između pasmina kretale u rasponu od 0,04 % do 3,94 %. Li i sur. (2004.) su ispitali genetsku varijabilnost kineskih i europskih pasmina svinja pomoću seta od 19 mikrosatelita. Rezultati su ukazali na veću pasminsku i međupasminsku varijabilnost kineskih pasmina nego što je to kod europskih pasmina. Michailidou i sur. (2014.) su istražili genetsku raznolikost grčkih crnih pasmina svinja uz set od 11 mikrosatelita. U navedenom istraživanju mikrosatelitski markeri pokazali su visoki stupanj polimorfizma unutar i između populacija temeljem broja alela po lokusu i njihove genetske heterozigotnosti što upućuje na visoki stupanj varijabilnosti unutar pasmine.

1.1.4.2. Mitohondrijska DNK (mtDNK)

Mitohondrijska DNK (mtDNK) je dvolančana uzvojnica koja se sastoji od lakog i teškog lanca. Ona se koristi kao molekularan marker u populacijskog i evolucijskoj biologiji. Prednosti korištenja mtDNK su visoki stupanj mutacije u odnosu na jezgrinu DNK, jednostavna organizaciju i izolacija, nedostatak rekombinacija i nasljeđivanje putem majke. (Galtier i sur., 2009.). Nekodirajuća regija nalazi se između gena za $tRNK_{Pro}$ i $tRNK_{Phe.}$ Dvije nekodirajuće regije nalaze se iznad D-petlje i to je područje replikacije H-lanca, dok je druga nekodirajuća regija mjesto replikacije L-lanca (Cooper i Hausman, 2004.). Prednosti analize mtDNK je njezina zastupljenost u velikom broju kopija te je stoga njezina detekcija lakša, a osim toga mtDNK nije podložna degradaciji tijekom samog procesa izolacije što olakšava izolaciju te smanjuje mogućnost degradacije (Murugaiahet i sur., 2015.).

MtDNK s velikim brojem kopija po jednoj stanici predstavlja prirodan izvor genetske varijabilnosti. Mitohondrijski genom najbolje je istražen od svih tipova eukariotskih DNK. Regija D-petlje je njezin najvarijabilniji dio koje sudjeluje u procesima replikacije i transkripcije. MtDNK svinja određena je dužinom polimorfizma u kojoj svaki od njih može biti dužine od 14 do 29 ponavljajućih jedinica (Ursing i Arnason, 1998.). Dužina mtDNK svinja nije konačna zbog toga što heteroplazmija dovodi do različitog broja ponavlja u kontrolnoj regiji. Njezina dužina kod svinja iznosi 16679 nukleotida. Novije metode analize, autentifikacije proizvoda, analize 12S RNK, 16 S RNK, *ND5* i *ND2* te identifikacija pasmina uključuju analizu gena za citokrom b koji se nalazi na mtDNK. Citokrom b je jedan od najbolje istraženih gena mitohondrijske DNK. On je dio kompleksa III koji se sastoji od tri katalitičke podjedinice (I,II,III). Primjena gena citokroma b za identifikaciju različitih vrsta životinja u uzorcima mesa postala je standardna metoda nakon što su to u svom istraživanju po prvi puta primijenili Kocher i sur. (1989.). Prednosti uporabe ovog gena u istraživanjima su slaba podložnost nesinonimskim supstitucijama te mogućnost usporedbe različitih istraživanja u kojima je korišten ovaj gen zbog njegove visoke zastupljenosti u velikom broju istraživanja. Osim toga, gen za citokrom b je varijabilan na razini populacije, ali dovoljno očuvan kako bi mogao razjasniti složene filogenetske odnose (Galtier i sur., 2009.; Murugaiahet i sur., 2015.).

Slika 9. MtDNK svinja
(Izvor: http://humupd.oxfordjournals.org/content/12/4/401.full)

Chen i sur. (2011.) usporedili su regiju D-petlje i sekvencu mitohondrijskog genoma između azijskih i europskih pasmina svinja. Cilj istraživanja bio je istražiti cijelu nukleotidnu sekvencu mitohondrijskog genoma tajvanske lanyu pasmine svinja te napraviti filogenetsku analizu navedene pasmine. U istraživanju je korištena lanyu pasminu svinja koju je definirana kao neovisni genetski ogranak, odnosno pasminasvinja koja je genetski značajno udaljena od europskih i azijskih pasmina. Rezultati filogenetske analize su ukazali na veliku genetsku udaljenost lanyu pasmine s Europskim i Azijskim pasminama svinja te malu frekvenciju genetske razmjene s ostalim pasminama svinja. Autori su zaključili da lanyu pasmina predstavlja neovisnu genetsku granu u filogenetskom stablu različitih pasmina svinja.

Dai i sur. (2015.) su u svom istraživanju razvili metodu autentifikacije proizvoda različitih vrsta domaćih životinja temeljem analize mitohondrijskog gena za citokrom c oksidazu-podjedinicu 1 (*COI*). Dizajnirano je sedam početnica specifičnih za vrstu koje su imale visoko heterozigotne regije mitohondrijskog *COI* gena. Za dizajnirane početnice je prethodno dokazano da su specifične za pojedinu vrstu te da neće doći do interakcije sa stranom DNK koja se može naći u analiziranom uzorku. Združenom PCR reakcijom identificirane su najzastupljenije vrste domaćih životinja u uzorcima mesa. Razina

osjetljivosti je bila vrlo visoka što znači da je već i 0,1 mg svinjskog mesa u analiziranom uzorku moglo biti detektirano. Dong i sur. (2016.) su proveli istraživanje u kojem su sekvencirali mitohondrijski genom meišan svinje te proveli filogenetsku analizu u kojoj su usporedili mitohondrijski genom s metagenomom 21 pasmine svinja. Rezultati su pokazali formiranje tri različita klastera od kojih su jedan činili meišan pasmina, veliki jorkšir i 18 drugih pasmina svinja. Landras i durok su bili u drugom klasteru, a java i visayan pasmina bile su grupirane u trećem klasteru. Autori su zaključili da je raspodjela pasmina posljedica različitih smjerova domestikacije, dok van Asch i sur. (2012.) navode da je središnja Europa bila centar domestikacije i ishodište višestruke domestikacije u različitim regijama. Autori su istražili genetsku povezanost i tok gena između divljih svinja i Iberijske pasmine svinja. Rezultati istraživanja su ukazali na malu genetsku udaljenost između altežano i iberijske svinje u odnosu na divlju svinju što ukazuje na to da se uzgoj iberijske svinje u počecima nije oslanjao samo na uvezenim pasminama svinja iz Središnje Europe već su veliki utjecaj u uzgoju imale i divlje svinje koje su živjele na području Španjolske. Frantz i sur. (2015.) su istražili više od 100 mitohondrijskih sekvenci te testirali tok domestikacije svinja, tj. mogućnost tijeka domestikacija standardnim linearnim modelom ili kompleksnim retikularnim modelom. Analiza mtDNK uz primjenu dva modela analize je ukazala da su reprodukcijske izolacije i selekcije imale utjecaj na tok gena proces domestikacije svinja. Istraživanje koje su proveli Li i sur. (2016.) potvrdilo je utjecaj prirodne i planske selekcije na metogenom. Istraživanjem je bilo obuhvaćeno 10 pasmina svinja s područja Tibeta i Kine s ciljem utvrđivanja utjecaja selekcije na mitohondrijski genom. Dokazana je veća nukleotidna raznolikost kod divljih tibetanskih svinja u odnosu na domaće pasmine, no niska nukleotidna raznolikost u 12S ribosomalne RNK što ukazuje na selekciju tih gena.

1.1.4.3. Polimorfizam jednog nukleotida

Polimorfizam jednog nukleotida (eng. Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) je najčešća varijacija koja se javlja u fragmentu DNK. Smatra se da je nukleotid polimorfan ukoliko on postoji u najmanje dvije inačice uz uvjet da je učestalost češće inačice manja od 99 %. Do sada otkriveni SNP-ovi pohranjeni su u bazi podataka koja je javno dostupna na http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP; http://snp.cshl.org. Obzirom na veliki broj otkrivenih SNP-ova, važno je razlučiti one koji su važni od onih koji nisu, tj. one koji utječu na funkciju i ekspresiju gena (Jadan i sur., 2004.). Negrini i sur. (2008.) navode da učestalost SNP-ova može biti svakih 500 baznih parova uz to da se oni često javljaju i izvan kodirajućih regija. U

genetskim istraživanjima SNP-ovi se primjenjuju u utvrđivanju bioraznolikosti vrsta, određivanju individualne sljedivosti te određivanju roditeljskih jedinki (Farrag i sur., 2010.). S obzirom na njihovu veliku frekvenciju u genomu, genetsku stabilnost te mogućnost analize primjenom novih genetskih metoda, SNP markeri često puta zamjenjuju mikrosatelite u genetskim analizama. Razvoj platformi za analizu SNP markera dovela je do smanjivanja troškova njihove analize te brže dobivanje rezultata. Ramos i sur. (2011.) navode da je nedostatak primjene ove metode analize pomoću SNP-ova nemogućnost analize namirnica koje se sastoje od više različitih životinjskih vrsta, tj. patvorenih proizvoda zbog toga što se u rezultatima može javiti kombinacija različitih pikova koji predstavljaju sve pasmine i vrste koje se nalaze u analiziranom uzorku.

Negrini i sur. (2008.) proveli su istraživanje kojim su pokazali važnost SNP markera za određivanje sljedivosti proizvoda putem autentifikacije proizvoda s obzirom na izvornost i geografsko podrijetlo. Kombinacijom SNP analize te Beysan statistike analizirano je 24 pasmine goveda iz pet europskih zemalja (Španjolska, Portugal, Grčka, Francuska i Italija). Analizirano je 1047 životinja uz set od 90 SNP markera smještenih na 72 gena koji su pokazali potencijalni utjecaj na kvalitetu mesa te proizvodna svojstva. Rezultati istraživanja su ukazali da je identifikacija moguća kod najmanje 97 % životinja što je autore navelo na zaključak da su SNP markeri dobar alat koja će omogućiti identifikaciju životinja te praćenje geografske sljedivosti što je od posebne važnosti za proizvode s oznakama izvornosti ili geografskog podrijetla. U istraživanju koje su proveli Kim i sur. (2010.) SNP markeri su se pokazali kao markeri kojima se uz 100 % sigurnost može potvrditi roditeljstvo jedinka. U istraživanju je korišten 51 SNP marker, a rezultati su ukazali na mogućnost određivanja i praćenja podrijetla jedinke kako bi se u konačnici mogla pratiti sljedivost domaćih pasmina svinja. Ramos i sur. (2011.) su istražili SNP-ove specifične za različite pasmine svinja (durok, landras, veliki jorkšir, pietren i divlja svinja) te istražili mogućnost primjene takvih SNP-ova za daljnju identifikaciju pasmina. Ukoliko se analizirane životinje koriste kao referenta populacija prilikom analize drugih životinja iz iste populacije, uspješnost identifikacije je 99 % što ukazuje na to da su markeri specifični za vrstu dobar alat za identifikaciju te autentifikaciju. Goedbloed i sur. (2013.) su pomoću Illumina PorcineSNP60 BeadChip koji može genotipizirati do 60 000 SNP-ova u genomu svinje, procijenili razinu genetskog miješanja domaćih i divljih populacija svinja. Fontanesi i sur. (2014.) proveli su istraživanje u kojem su genotipizirali polimorfizme u dva gena; *MC1R* koji je povezan s bojom dlake svinja, te *NR6A1* koji je povezan s brojem vratnih kralježaka. Cilj istraživanja bio je odrediti podrijetlo mesa u proizvodu s obzirom na to radi li se o mesu divljih ili domaćih pasmina

svinja. Rezultati istraživanja su ukazali na veću točnost analize u slučaju korištenja oba gena s obzirom na to da *NR6A1* kontrolira fenotipsko svojstvo. U istraživanju koje su proveli Fontanesi i sur. (2016.) analiziran je *KIT* gen odgovoran za boju dlake svinja kod talijanske pasmine Cinta Sense. Identificiran je jedan SNP u različitim haplotipovima *KIT* gena kod različitih pasmina svinja. SNP (g.43597545C4T) je pozicioniran na kromosomu 8 te je genotipiziran kod 11 različitih pasmina svinja te divlje svinje. Utvrđeno je da je alel *T* fiksiran kod Cinta Sense (95,9 %) no isto tako njegova prisutnost nije utvrđena kod ostalih pasmina svinja. SNP je fiksiran kod pasmine Cinta Sense te predstavlja alel koji ujedno određuje i boju dlake navedene pasmine. Pronađeni SNP se može smatrati DNK markerom pomoću kojeg je moguće diferencirati meso Cinta Sense od mesa ostalih pasmina koje nemaju karakteristiku belt fenotipa.

1.1.4.4. DNK barkodiranje

Hebert i sur. (2003.) razvili su metodu DNK barkodiranja kojom je autentifikacija proizvoda postala znatno brža i jednostavnija. DNK barkodiranje predstavlja način identifikacije vrste u kojem infracrveni skener jednoznačno identificira produkte koristeći crne trake univerzalnog koda (eng. Universal Product Code, UPC). Dvije su karakteristike DNK barkoda, a to su njegova univerzalnost, odnosno točno umnažanje njegove genomske regije, tj. odabranog DNK barkoda, i visoka rezolucija kojom se osigurava identifikacija različitih vrsta temeljem interspecifičnih razlika u sekvenci. Ciljani fragment DNK barkodiranja je standardizirani fragment veličine 650 baznih parova koji se nalazi na *COI* genu. Idealan barkod trebao bi imati više interspecifične varijabilnosti nego intraspecifične. Varijabilnost između intraspecifične i interspecifične genetske varijacije je teško razlikovati što predstavlja nedostatak barkodiranja i diversifikacije vrsta. Osim toga, ne postoji univerzalan gen za DNK barkodiranje, tj. ne postoji gen koji je očuvan u toj mjeri da pokazuje različitost sekvenci kojom bi se moglo razlikovati više vrsta životinja. Kako bi se moglo koristiti DNK barkodiranje kao metodu za razlikovanje vrsta i pasmina, a samim time i za daljnji proces autentifikacije, potrebno je utvrditi referentnu sekvencu za svaku pojedinu vrstu. Sekvence barkodova su kratke, a mogu biti od 500 baznih parova do 1000 baznih parova (Kress i Erickson, 2012..; Ali i sur., 2014.; Barcaccia i sur., 2015.).

Ali i sur. (2014.) navode razloge za primjenu DNK barkodiranja u istraživanjima, a to su mogućnost analize tijekom svih faza životnog ciklusa, analiza malih fragmenata, smanjivanje dvosmislenosti dobivenih rezultata, brza identifikacija poznatih organizama i

mogućnost prepoznavanja novih te povezivanje identifikacije životinja s novih tehnologijama DNK sekvenciranja što će u konačnici dovesti do razvoja novih platformi i pojednostavljenja postupka analize. Nadalje, barkodiranje je ukazalo na važnost stvaranja baze podataka s informacijama o genetskom potpisu životinja. Ovo je metoda koja svoju primjenu najviše nalazi u autentifikaciji ribljih vrsta i proizvoda dobivenih od ribljeg mesa (Ugochukwu i sur., 2015.; Tagliavia i sur., 2016.) no svoju budućnost može pronaći i u autentifikaciji proizvoda dobivenih od mesa svinja. Osim toga, budućnost navedene metode leži i u područjima biosigurnosti, očuvanja divljih i egzotičnih životinja te u provedbi forenzičkih analiza. Metodu DNK barkodiranja su primijenili Colombo i sur. (2011.) gdje su identificirali razne vrste domaćih životinja u mesu i mesnim prerađevinama komparativnom analizom sekvence *COI* gena. Veliki broj istraživanja uz pomoć ove metode proveden je i na području autentifikacije mesa i prerađevina od divljači (Quinto i sur., 2016.).

1.1.4.5. Mikročipovi

Od prvog pojavljivanja tijekom 1980. godina do danas mikročipovi su postali alat za provođenje analiza u području sigurnosti hrane i autentifikacije. Primjena mikročipova temelji se na spajanju različitih proba s različitim pozicijama na čipu što omogućava istovremeno praćenje velikog broja umnoženih fragmenata, a samim time i detekciju većeg broja različitih životinjskih vrsta u uzorku koji se analizira (Teletchea i sur., 2008.). Često puta se uspoređuju dvije metode analize, metoda qPCR i mikročipova. Primjena čipova značajno je brža i preciznija u odnosu na metode koje se temelje PCR metodi. Međutim, u odnosu na qPCR, mikročipovi imaju znatno nižu razinu detekcije te stoga nije moguće dobiti kvantitativne informacije kojima bi se točno mogao utvrditi odnos slučajnog i namjernog dodavanja stranih supstanci u mesne prerađevine (Iwobi i sur., 2011.). Dostupna su dva tipa DNK mikročipa specifična za vrste, a to su CHIPRON LCD kit (Chipron, Njemačka) koji se odnosi na 16S rRNK gen te CarnoCheck sustav detekcije (Greiner BioOne) koji se temelji na genu za mitohondrijski citokrom b. Pomoću CHIPRON LCD kit moguće je identificirati 14 različitih vrsta životinja (svinje, koze, ovce, goveda, zečeve, konje, magarce, bizone, kokoši, patke, kuniće, guske i pure). CarnoCheck sustav detekcije može identificirati 8 različitih vrsta životinja, a to su kokoši, pure, magarci, konji, svinje, goveda, ovce i koze (Ali i sur., 2012.). Primjena DNK čipova služi kao brza metoda provjere proizvoda od mesa. Provedeno je niz istraživanja u kojima su se mikročipovi primjenjivali za identifikaciju različitih vrsta. Teletcha i sur. (2008.) razvili su metodu temeljenu na mikročipovima kojom su analizirali

veliki broj životinjskih vrsta u uzorcima. Istraživanjem je identificirano 40 vrsta sisavaca, 9 vrsta ptica, 28 vrsta riba i 2 vrste morskih pasa. Slično istraživanje proveli su Chisholm i sur. (2008.) no oni su uspjeli identificirati 30 različitih vrsta životinja iz uzoraka mesa koji su bili analizirani.

1.1.5. Razine autentifikacije

1.1.5.1. Autentifikacija pasmine

Autentifikacija pasmine u proizvodima služi za utvrđivanje podrijetla proizvoda. Autentifikacija se temelji na PCR analizi te daljnjoj analizi dobivenih podataka. Na ovaj način želi se osigurati to da je proizvod dobiven od pasmine kojom je deklariran. Provedbom ovog pristupa otvara se mogućnost zaštitite proizvoda oznakama izvornosti, zemljopisnog podrijetla ili tradicionalnog proizvoda. U postupku autentifikacije pasmine koriste se dva pristupa, a to su deterministički i probabilistički pristup. Deterministički pristup se temelji na korištenju specifičnih markera kojima se može potvrditi prisutnost pasmine u nekom proizvodu (Haunski i sur., 2009), dok probabilističkim pristupom u analizi koristimo neki od markerskih sustava (SSR, AFLP, SNP) (Nicoloso i sur., 2013.; Fontanesi i sur., 2016.). Deterministički pristup analize oslanja se na prisutnost ili nedostatak markera kod svih životinja određene pasmine. Markeri se identificiraju tako da se lociraju mutacije onih gena koji su specifični za određenu pasminu, kao što je primjerice boja dlake ili neka proizvodna svojstva (Russo i sur., 2007.). Nedostatak probabilističkog pristupa ogleda se u nemogućnosti određivanja podrijetla pasmine u proizvodima koji se sastoje od više različitih pasmina životinja. Napredak u razvoju tehnologija genotipiziranja koje se temelje na analizi SNP-ova imati će pozitivan utjecaj na probabilistički pristup analize. Odabir markera kojima bi se moglo identificirati pasminu ovisi o genetskom potpisu koji proizlazi iz selekcije unutar same pasmine. No s obzirom na to da pasmine nisu razdvojene isključivo geografskim i biološkim granicama nego i genetskim granicama, identifikacija pasmine specifičnim DNK markerima predstavlja izazov u daljnjim istraživanjima (Dalvit i sur., 2008.). Alves i sur. (2002.) i Vega-Pla i sur. (2003.) proveli su istraživanje kojim su identificirali križance iberijske svinje i duroka te pripadnike čiste durok pasmine i iberijske pasmine svinja. Metoda kojom su identificirali navedene pasmine bile su genotipiziranje multilokusa repetetivne sekvence i analiza polimorfizma dužine jednog fragmenta.

1.1.5.2. Autentifikacija vrste

Identifikacija vrste važna je s aspekta očuvanja bioraznolikosti i očuvanja vrste. Identifikacija vrste predstavlja najviši nivo zaštite, što se ogleda u kasnijim procesima autentifikacije proizvoda. Identifikacija vrste predstavlja prvu metodu probira kojom se dokazuje podrijetlo proizvoda s obzirom na vrstu, a često i zemljopisnu regiju. Ovaj tip identifikacije u proizvodima nije moguće provoditi senzornim metodama zbog čega su razvijene metode analize specifičnih za pojedine vrste. To su metode koje se temelje na izvođenju PCR te traženju fragmenata DNK čije sekvence sadrže informacije o podrijetlu pasmine (Mafra i sur., 2008.; Ali i sur., 2014.; Dai i sur., 2015.). Korištenjem specifično dizajniranih oligonukleotida uz specifične PCR uvjete moguće je identificirati specifične DNK fragmente određene životinjske vrste. Dizajniranje i primjena početnica specifičnih za pojedinu vrstu koristi se za autentifikaciju mesa različitih vrsta domaćih životinja (goveda, svinje, ovce, koze, kokoši) (Haunshi i sur., 2009.). Rojas i sur. (2009.) navode prednosti primjene početnica specifičnih za vrstu, a to su analiza kratkih DNK fragmenata što analizu čini jednostavnom, specifičnom i visoko senzitivnom. Nedostatak primjene ove metode ogleda se u potrebi za točnim podacima o ciljanoj sekvenci kako bi se mogla dizajnirati odgovarajuća specifična početnica.

1.1.5.3. Autentifikacija životinje

Individualna autentifikacija, tj. identifikacija životinje omogućuje dobivanje informacija za cjelokupni lanac sljedivosti životinja i njihovih proizvoda. Osim toga, ovim pristupom se mogu dobiti i informacije o pasmini i spolu životinje. Ukoliko se ovakav način sljedivosti temelji na analizi DNK, ono mora uključivati genotipiziranje životinja na svim točkama, stvaranje specifične baze podataka i konstruiranje biorepositorija (Fontanesi, 2009.). Navedeni način analize uključuje primjenu mikrosatelitskih markera i SNP markera. Razvijeni paneli mikrosatelita i SNP-ova koriste se za testiranje podrijetla i određivanje individualne sljedivosti. Zbog automatskog genotipiziranja i lakšeg čitanja panela koji uključuju od 30 do 50 markera, SNP-ovi često puta zamjenjuju mikrosatelite u ovakvim analizama (Rohrer i sur., 2007.).

1.1.5.4. Autentifikacija po spolu

Testovi za određivanje spola mogu biti temelj za testiranje roditelja pomoću spolno specifičnih markera. Konvencionalna metoda određivanja spola je analiza spolno specifičnih hormona. Primjenom plinske kromatografije/masene spektrometrije (GC/MS) (Janssens i sur., 2015.), tekućinske kromatografije-masene spektrometrije/masene spektrometrije (HPLA/MS/MS) (Barreiro i sur., 2015.) te imunoenzimskog testa visoke osjetljivosti (ELISA) (Parois i sur., 2015.) moguće je mjeriti razinu spolnih hormona te odrediti spol životinje. Međutim, najučestaliji način određivanja spola životinja je primjena PCR metode koja uključuje gel elektroforezu za određene umnožene fragmente. Metode za određivanje spola temelje se na amplifikaciji specifične sekvence Y kromosoma pomoću metode PCR ili amplificiranjem homolognih fragmenata oba spolna kromosoma (Fontanesi, 2009.). Regije DNK koje se mogu koristiti za određivanje spola jedinki uključuju cink finger gene (*ZFX* i *ZFY*) (Schmoll i sur., 1996.; Poloumienko, 2004.), spolne regije na Y kromosomu (*SRY*) (Pailhoux i sur., 1994.; Świtoński i sur., 2002.; Rousseau i sur., 2013.) i gena za zubni amelogenin (*AMELX* i *AMELY*) (Fontanesi i sur., 2008.; Abdulmawjood i sur., 2012.; Tsoi i sur., 2016.). Novije metode analize spola odnose se na primjenu qPCR temeljenog na TaqMan® tehnologiji, a usmjerenog na specifičan *SRY* gen na kromosomu Y te na gen za proteolipidni protein na kromosomu X (Petrov i sur., 2014.).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Postavljeni su sljedeći ciljevi istraživanja:

- Načiniti genetsku sliku sadašnje populacije crne slavonske svinje pomoću mikrosatelita kao molekularnih markera.
- Utvrditi mogući stupanj inbridinga unutar populacije i heterozigotnost lokusa.
- Ispitati metodu utvrđivanja genetskog statusa pasmine na temelju boje dlake pomoću polimorfizma jednog nukleotida (Eng. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) u *MC1R* genu.
- Optimizirati najmanji broj mikrosatelitskih markera kojima je moguće napraviti autentifikaciju proizvoda crne slavonske svinje.
- Statistički ispitati uspješnost odabranog seta mikrosatelitskih markera odabranih za autentifikaciju proizvoda od crne slavonske svinje.

Hipoteze:

- Mikrosateliti, kao genetski markeri, daju nam potpuniju sliku o genetskom statusu populacije crne slavonske svinje.
- Unutar populacije crne slavonske svinje postoji određeni stupanj inbridinga i heterozigotnost lokusa.
- Utvrđivanje genetskog statusa crne slavonske svinje moguće je provesti pomoću polimorfizma jednog nukleotida (SNP) u *MC1R* genu.
- Dizajniranje seta optimalnog broja mikrosatelitskih markera omogućit će identifikaciju pasmine i autentifikaciju proizvoda od crne slavonske svinje.
- Smanjivanje broja mikrosatelitskih markera dati će dovoljnu informacija za interpasminsku identifikaciju.
- Smanjivanje broja mikrosatelitskih lokusa dati će dovoljno informacija za intrapasminsku identifikaciju te odvajanje subpopulacija crne slavonske pasmine.

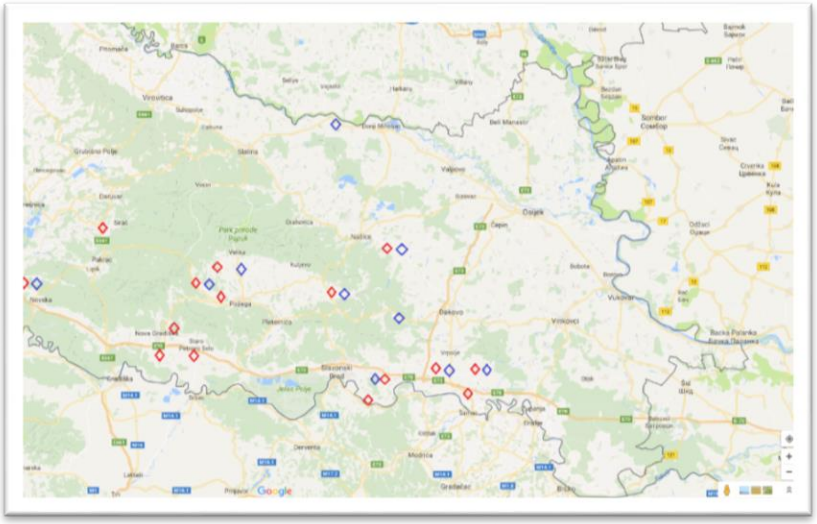
3. MATERIJAL I METODE RADA

3.1. Eksperimentalne životinje

Genotipizacija mikrosatelitih lokusa je provedena na 107 životinja od kojih je bilo 50 svinja crne slavonske pasmine (CS), 15 PIC hibrida, 12 pietraina (P), 10 topigsa (TP), 10 velikih jorkšira (J), 5 landrasa (L) i 5 duroka (D). Od ukupno analiziranih 100 svinja crne slavonske pasmine kod kojih smo odredili genotip *MC1R* gena odabrano je 30 životinja homozigota za crnu boju (CS), te 20 životinja heterozigota (CSX).

3.2. Prikupljanje uzoraka

Uzorci krvi prikupljeni su od svinja koje su boravile na području 5 slavonskih županija: Osječko baranjske, Vukovarsko srijemske, Brodsko-posavske, Požeško slavonske i Virovitičko podravske. Prikupljeni su s prostorno udaljenih područja zbog smanjivanja mogućnosti pojave srodstva između svinja. Uzorci homozigota za MC1R gen prikupljeni su s 15 različitih farmi, dok su uzorci heterozigota prikupljeni s 10 farmi. Uzorci krvi uzeti su ubodom igle u vratnu venu (*vena jungularis*) u količini od 3 ml. Krv je pohranjena u vakutajnere koji su sadržavali antikoagulans K_3. Uzorci su zatim zamrznuti na -20°C do njihove daljnje obrade. Lokacije na kojima su prikupljeni uzorci crnih slavonskih svinja prikazani su Slikom 11.



Slika 10. Lokacije na kojima su prikupljeni uzorci homozigota za crnu boju (crvena boja) po genotipu MC1R gena te križanaca (crna boja)

3.3. Izolacija DNK

Ukupna DNK izolirana je iz uzoraka krvi korištenjem Thermo Scientific Gene Jet Genomic DNA Purification Kita. GeneJet kit za izolaciju DNK dizajniran je za brzu i učinkovitu izolaciju genomske DNK. Princip rada ovog kita su kolonice koje za sebe vežu DNK. Genomska DNK izolirana je iz uzorka od 200 µl krvi. Nakon dodatka 400 ml lizis pufera i 20 ml proteinaze K te vorteksiranja, otopina je inkubirana na 56°C tijekom 10 minuta. Dodatkom 200 µL 96 % alkohola te vorteksiranjem završava prva faza izolacije. Tako pripremljena otopina prenosi se u tubice centrifugira tijekom 1 minuta na 6000 x g i ispere s 500 µL pufera za ispiranje. Postupak je ponovljen uz različite brzine centrifugiranja. Zadnji korak uključuje prenošenje isprane otopine u mikrocentrifugalnu epruvetu te dodatak 200 ml elucijskog pufera u središte Gene JET Genomic DNK kolone za pročišćavanje kako bi se dobila genomska DNK. Nakon inkubacije i zadnjeg centrifugiranja provjerena je uspješnost izolacije DNK. Izolirana DNK zatim je pohranjena na – 20°C te je kasnije korištena za genotipizaciju mikrosatelitskih lokusa.

3.3.1. Provjera izolacije

Uspješnost izolacije provjerena je elektroforezom na 1,0 % agaroznom gelu. Agarozni gel pripremljen je u Elrenmayerovoj tikvici u odgovarajućem omjeru agaroze (SeaKem LE, Byozim) i 0,5 x TBE. Korišten je pufer 0,5 x TBE (50 mMTris base (Sigma), 50 mM borne kiseline, 1 mM EDTA, pH 8,0). Nakon kuhanja i hlađenja na magnetnoj miješalici, gel je stavljen u kadicu s pripremljenim češljevima. Slijedilo je potpuno hlađenje gela te pripremanje uzorka DNK i boje kako bi se pratila brzina prolaska fragmenata DNK kroz agarozni gel.

3.4. Analiza *MC1R* genotipova

Nakon izolacije DNK slijedilo je izvođenje jednostavne PCR-RFLP metode (eng. Restriction fragmenth length polymorphism; polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata) koja se temelji na različitim *MC1R* genotipovima (Margeta, 2013.). Korišten je par početnica za umnažanje eksona *MC1R* gena. MERL1 (5'-RGTGCCTGGAGGTGTCCAT-3') i EPIG2 (5'-CGCCCAGATGGCCGCGATGGACCG-3') početnice korištene su za umnažanje 428 bp produkta s 5' kraja *MC1R* gena. PCR reakcija je provedena u ukupnom volumenu od 20 µl od čega je bilo 20 ng genomske DNA, 100 µM deoksinukleotidnu mješavinu (dATP, dCTP,

dGTP, dTTP, Thermo Scientific), 1,5 nM $MgCl_2$, 0,5 µM od obje oligonukleotidne početnice, 0,5 U DNA Taq polimeraze (Fermentas), 1 x PCR buffer (10 mMTris, pH 8,3, 50 mM KCl, Fermentas) i bidestilirane vode do ukupnog volumena od 20 µl. Restrikcija je izvršena pomoću *Nsp*I (*ThermoScientific*) restrikcijske endonukleaze, a s ciljem utvrđivanja nukleotidnog mjesta 282. Uspješnost digestije provjerena je na 2 %-tnom agaroznom gelu.

3.5. Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa

3.5.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančanom reakcijom polimerazom umnažali su se sljedeći mikrosatelitni lokusi: S0026, S0155, S0005, Sw2410, Sw830, S0355, Sw24, Sw632, Swr1941, Sw936, S0218, S0228, Sw122, Sw857, S0097, sw240, IGF1, Sw2406, Sw72, S0226, S0090, Sw2008, Sw1067, S0101, S0178, Sw911 i S0002 (Prilog 1.). Prema ISAG-FAO preporuci za genescan analizu korišten je set od 27 mikrosatelita. Odabranih 27 mikrosatelitna markera podijeljeni su u tri združene reakcije koje su se sastojali od po 9 mikrosatelita. Mikrosateliti su odabrani i grupirani obzirom na dužinu, odnosno kriterij njihovog odabira bila je nemogućnost preklapanja njihovih duljina. U svakoj združenoj reakciji po tri mikrosatelita bila su označena istom bojom (Tablica). Za označavanje uzvodnih početnica korištena je jednu od tri fluorescentne boje (F- 6-FAM – plava, ATTO550- žuta ili crna, H- HEX zelena). Uzvodne početnice sintetizirali su Metabion International, Planegg, Njemačka, dok su neoznačene, nizvodne početnice sintetizirane u Macrogenu. Za provođenje PCR reakcije korišten je QUIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN GmbH, Germany). Navedeni kit optimiziran je za izvođenje združenih PCR reakcija mikrosatelitskih lokusa. Master Mix sastojao se od HotStarTaq® DNA polimeraze, Multiplex PCR pufera, dNTPa iQ otopine.

Tablica 6. Tri združene PCR reakcije te sljedovi nizvodnih i uzvodnih početnica koje su bile obilježene jednom od tri fluorescentne boje: F- 6-FAM (plava); A- ATTO559 (žuta); H- HEX (zelena)

Združeni PCR	Mikrosateliti	Kromosom	Sekvenca početnice (5' -> 3')	Temperatura	Veličina fragmenta
1	S0026	16	F-AACCTTCCCTTCCCAATCAC CACAGACTGCTTTTTACTCC	55°C	87 - 105
	S0155	1	F-TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG AAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT	55°C	142 - 162
	S0005	5	F-TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCTGATTCTGGGTA	55°C	203 - 267
	Sw241	8	A-ATTTGCCCCCAAGGTATTTC CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	50°C	90 - 131
	Sw830	10	A-AAGTACCATGGAGAGGGAAATG ACATGGTTCCAAAGACCTGTG	50°C	168 - 203
	S0355	15	A-TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	50°C	244 - 271
	Sw24	17	H-CTTTGGGTGGAGTGTGTGC ATCCAAATGCTGCAAGCG	55°C	95 - 124
	Sw632	7	H-TGGGTTGAAAGATTTCCCAA GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA	55°C	148 - 178
	Swr1941	13	H-AGAAAGCAATTTGATTTGCATAATC ACAAGGACCTACTGTATAGCACAGG	55°C	202 - 224
2	Sw936	15	F-TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC GTGCAAGTACACATGCAGGG	55°C	90 - 116
	S0218	X	F-GTGTAGGCTGGCGGTTGT CCCTGAAACCTAAAGCAAAG	55°C	158 - 205
	S0228	6	F-GGCATAGGCTGGCAGCAACA AGCCCACCTCATCTTATCTACACT	55°C	220 - 246
	Sw122	6	A-CAAAAAAGGCAAAAGATTGACA TTGTCTTTTTATTTTGCTTTTGG	55°C	106 - 128
	Sw857	14	A-TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC GATCCTCCTCCAAATCCCAT	55°C	141 - 159
	S0097	4	A-GACCTATCTAATGTCATTATAGT TTCCTCCTAGAGTTGACAAACTT	55°C	209 - 250
	sw240	2	H-AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA	55°C	92 - 124
	IGF1	5	H-GCTTGGATGGACCATGTTG CATATTTTTCTGCATAACTTGAACCT	55°C	193 - 209
	Sw2406	6	H-AATGTCACCTTTAAGACGTGGG AATGCGAAACTCCTGAATTAGC	55°C	222 - 262
3	Sw72	3	F-ATCAGAACAGTGCGCCGT TTTGAAAATGGGGTGTTTCC	55°C	97 - 114
	S0226	2	F-GCACTTTTAACTTTCATGATACTCC GGTTAAACTTTTNCCCCAATACA	55°C	180 - 210
	S0090	12	F-CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG	55°C	227 - 249
	Sw2008	11	A-CAGGCCAGAGTAGCGTGC CAGTCCTCCCAAAAATAACATG	55°C	95 - 108
	Sw106	6	A-TGCTGGCCAGTGACTCTG CCGGGGGATTAAACAAAAAG	55°C	136 - 176
	S0101	7	A-GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG GTCTCCCTCACACTTACCGCAG	58°C	197 - 221
	S0178	8	H-TAGCCTGGGAACCTCCACACGCTG GGCACCAGGAATCTGCAATCCAGT	60°C	101 - 128
	Sw911	9	H-CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGAAAAAAAAAGCC	60°C	149 - 173
	S0002	3	H-GAAGCCAAAGAGACAACTGC GTTCTTTACCCACTGAGCCA	60°C	186 - 216

F- 6-FAM (plava); A- ATTO550 (žuta); H- HEX (zelena)

3.5.2. Optimizacija združenih reakcija

3.5.2.1. Optimizacija prve združene reakcije

Cilj optimizacije reakcija je definirati mikrosatelitske lokuse koje je moguće udružiti u skupine te ih u takvom obliku umnažati u PCR reakciji. Glavni uvjet udruživanja mikrosatelitiskih lokusa je njihov dužinski raspon. Mikrosateliti koji su udruženi u zajedničkoj reakciji se u svojim dužinskim rasponima ne smiju međusobno preklapati. Nadalje, potrebno je paziti na koncentracije pojedinih početnica zbog kompetetivnosti i stvaranja dimera početnica. Optimizacijom PCR reakcija dobiva se protokol za izvođenje PCR reakcije kojima se smanjuje mogućnost pogreške, skraćuje se vrijeme izvođenja reakcije te se smanjuju troškovi izvođenja iste. Svaki mikrosatelitski lokus optimiziran je pojedinačno. PCR reakcija je provedena u ukupnom volumenu od od 20 µl od čega je bilo 20 ng genomske DNA, 100 µM deoksinukleotidnu mješavinu (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 nM $MgCl_2$, 0,5 µM od obje oligonukleotidne početnice, 0.5 U DNA Taq polimeraze (Fermentas), 1 x PCR buffer (10 mMTris, pH 8,3, 50 mMKCl, Fermentas) i bidestilirane vode do ukupnog volumena od 20 µl. Uvjeti izvođenja PCR reakcije bili su sljedeći:

95˚C, 7min (početna aktivacija polimeraze)
35 ciklusa: 95˚C, 45s (denaturacija)
G 55˚C+/-3˚C, 50s (spajanje početnica)
72˚C, 20s (produljenje početnica)
72˚C, 7min (produljenje umnoženih sljedova DNK)
hold 4˚C
Gradijent: 55 ˚C+/-3˚C

Tablica 7. Gradijenti temperatura pri optimizaciji prve združene reakcije

Temperature			
1. 52,1°C	4. 53,0°C	7. 55,3°C	10. 57,5°C
2. 52,1°C	5. 53,6 °C	8. 56,1°C	11. 58,0°C
3. 52,4°C	6. 54,4°C	9. 56,9°C	12. 58,3°C

Najbolji rezultati postignuti su kod temperatura 56,1˚C i 56,9˚C. Prema protokolu proizvođača umiješane su početnice za prvih 9 mikrosatelita te pripremljene dvije PCR

otopine od kojih je jedna sadržavala Q otopinu dok je druga bez Q otopine. Izvršena je nova optimizacija PCR reakcije sa sljedećim temperaturama: 55,3˚C, 56,1˚C i 56,9˚C. Uvjeti izvođenja PCR reakcije bili su sljedeći:

Program MSMUOPT:

95˚C, 15min (početna aktivacija polimeraze)

35 ciklusa: 94˚C, 30s (denaturacija)

G 55˚C +/- 3˚C, 90s (spajanje početnica)

72˚C, 60s (produljenje početnica)

60˚C, 30min (produljenje umnoženih sljedova DNK)

hold 4˚C

Gradijent: 55˚C+/-3˚C

Najbolji rezultati postignuti su kod temperature 56,9˚C uz združenu reakciju koja je sadržavala Q-otopinu. Na osnovu rezultata optimizacije sastavljen je PCR program za prvu združenu reakciju MSMULTI1.

Program MSMULTI1:

95˚C, 15min (početna aktivacija polimeraze)

35 ciklusa: 94˚C, 30s (denaturacija)

57˚C, 90s (spajanje početnica)

72˚C, 60s (produljenje početnica)

60˚C, 30min (produljenje umnoženih sljedova DNK)

hold 4˚C

PCR reakcije provođene su u plastičnim tubicama od 0.2 ml, Micro-Strips&Caps (Advanced Biotechnologies LTD). Ukupni volumen PCR smjese bio je 20 µL. Združena reakcija sastojala se od 10 µL Qiagen Master Mix, 2 µL primer mix, 4,5 µL destilirane vode, 2 µL Q otopina te 200 ng uzorka DNK. Nakon završetka PCR reakcije, uzorci su pohranjeni na 4°C te poslani u Macrogen, NL, na genescan analizu.

3.5.2.2. Optimizacija druge združene reakcije

Svaki mikrosatelitski lokus optimiziranje pojedinačno. PCR mješavina se sastojala kao i kod optimizacije prve združene reakcije.
Uvjeti izvođenja PCR reakcije bili su sljedeći:

95˚C, 7min (početna aktivacija polimeraze)
35 ciklusa: 95˚C, 45s (denaturacija)
G 55˚C+/-5˚C, 50s (spajanje početnica)
72˚C, 20s (produljenje početnica)
72˚C, 7min (produljenje umnoženih sljedova DNK)
hold 4˚C
Gradijent: 55˚C+/-5˚C

Tablica 8. Gradijenti temperatura pri optimizaciji druge združene reakcije

Temperature			
1. 52,0°C	4. 53,6°C	7. 57,4°C	10. 61,2°C
2. 52,2°C	5. 54,7°C	8. 58,8°C	11. 62,0°C
3. 52,7°C	6. 56,1°C	9. 60,1°C	12. 62,4°C

Najbolji rezultati postignuti su kod temperatura 54,3˚C i 55,5˚C. Sukladno uputama proizvođača umiješana je sljedeću skupinu od devet mikrosatelita te pripremljena PCR otopine od kojih je jedna sadržavala Q otopinu, a druga je bila bez nje. Slijedila je nova optimizacije PCR reakcije uz sljedeće temperature: 54,9˚C, 55,5˚C i 56,7˚C.
Program MSMUOPT2:

95˚C, 15min (početna aktivacija polimeraze)
35 ciklusa: 94˚C, 30s (denaturacija)
G 55˚C +/- 5˚C, 90s (spajanje početnica)
72˚C, 60s (produljenje početnica)
60˚C, 30min (produljenje umnoženih sljedova DNK)
hold 4˚C
Gradijent: 55˚C+/-5˚C

Najbolji rezultati postignuti su kod temperature od 55.5˚C uz združenu reakciju koja je sadržavala Q otopinu. Na osnovu rezultata optimizacije sastavljen je PCR program za drugu združenu reakciju MSMULTI2.

Program MSMULTI2:

95˚C, 15min (početna aktivacija polimeraze)
35 ciklusa: 94˚C, 30s (denaturacija)
55,5˚C, 90s (spajanje početnica)
72˚C, 60s (produljenje početnica)
60˚C, 30min (produljenje umnoženih sljedova DNK)
hold 4˚C

Ukupni volumen PCR smjese bio je 20 µL, a svojim sastavom je bio isti kao i PCR smjesa za izvođenje prve PCR združene reakcije. Nakon završetka PCR reakcije, uzorci su pohranjeni na 4°C te poslani u Macrogen, NL, na genescan analizu.

3.5.2.3. Optimizacija treće združene reakcije

Svaki mikrosatelitski lokus optimiziran je pojedinačno. PCR mješavina se sastojala kao i kod optimizacije prve združene reakcije. Uvjeti izvođenja PCR reakcije bili su sljedeći:

95˚C, 7min (početna aktivacija polimeraze)
35 ciklusa: 95˚C, 45s (denaturacija)
G 56˚C+/-3˚C, 50s (spajanje početnica)
72˚C, 20s (produljenje početnica)
72˚C, 7min (produljenje umnoženih sljedova DNK)
hold 4˚C
Gradijent: 56˚C+/-3˚C

Tablica 9. Gradijenti temperatura pri optimizaciji treće združene reakcije

Temperature			
1. 53,0°C	4. 54,0°C	7. 56,3°C	10. 58,5°C
2. 53,1°C	5. 54,7°C	8. 57,1°C	11. 59,0°C
3. 53, °C	6. 55,4°C	9. 57,9°C	12. 59,3°C

Najbolje rezultate postignuti su kod temperature 57,1˚C. Sukladno uputama Qiagen Multiplex PCR mastermixa umiješano je sljedećih devet mikrosatelita te pripremljene PCR otopine od kojih je jedna sadržavala Q otopinu dok je druga bila bez nje. Slijedila je nova optimizacije PCR reakcije uz sljedeće temperature: 56,3˚C, 57,1˚C i 57,9˚C.

Program MSMUOPT3:

95˚C, 15min (početna aktivacija polimeraze)
35 ciklusa: 94˚C, 30s (denaturacija)
G 56˚C, +/- 3˚C 90s (spajanje početnica)
72˚C, 60s (produljenje početnica)
60˚C, 30min (produljenje umnoženih sljedova DNK)
hold 4˚C
Gradijent: 56˚C+/-3˚C

Najbolji rezultati postignuti su kod temperature 57,1˚C uz združenu reakciju koja je sadržavala Q otopinu. Na osnovu rezultata optimizacije sastavljen je PCR program za treću združenu reakciju MSMULTI3.

Program MSMUOPT3:

95˚C, 15min (početna aktivacija polimeraze)
35 ciklusa: 94˚C, 30s (denaturacija)
57˚C, 90s(spajanje početnica)
72˚C, 60s(produljenje početnica)
60˚C, 30min (produljenje umnoženih slijedova DNK)
hold 4˚C

Ukupni volumen PCR smjese bio je 20 µL, a svojim sastavom je bio isti kao i PCR smjesa za izvođenje prve dvije PCR združene reakcije. Nakon završetka PCR reakcije, uzorci

su pohranjeni na 4°C. PCR uzorci su poslani u Macrogen, NL, na genescan analizu. Rezultati analize .fsa dokumenti (elektroferogrami) su otvarani pomoću peakscanner i peak studio programa.

3.6. Statistička obrada podataka

Frekvencija alela, broj alela, promatrana i očekivana heterozigotnost izračunate su pomoću GENETIX 4.05.2 software paketa te programskog paketa GenAlEx (Belkhlir i sur., 2004.; Peakall i Smouse, 2012.). Pomoću istog programa je izračunata i Wrightova F_{is} statistika prema Weiru i Cockerhamu. Test odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže izračunat je pomoću GENEPOP 3.4 (Rousset, 2008.). Analiza se temeljila na Markov chain Monte Carlo (MCMC) metodi uz postavke programa od 100 serija (eng. batches), 5000 iteracija po seriji (eng. iterations per batch) te 10000 dememorizacijski broj (eng. dememorization number) (Guo i Thompson, 1992.). Statistička značajnost je utvrđena Fisherovim testom uz P<0,001***, P<0,01**, P<0,05*. Informacijski sadržaj polimorfizma (eng. polymorphism information content, PIC) izračunat je programom Cervus 3.0.7. (Marshal i sur., 1998.; Kalinowski i sur., 2007.).

Grafički prikaz odnosa između analiziranih pasmina svinja je proveden uz faktorijalnu analizu korespondencije (eng. factorial correspondence analysis; FCA) u programu GENETIX 4.05.2. Cilj primjene ove metode je sažimanje informacija o istraživanim jedinkama na temelju simultane analize više kvalitativnih svojstava (biljega). Ovo je metoda slična analizi glavnih sastavnica (eng. principal component analysis, PCA) pri čemu se FCA temelji na tablicama kontingencije nastalih unakrsnim tabeliranjem dok su osnova PCA kvantitativna svojstva. Programskom paketom PopTree2 (Takezaki i sur., 2010.) određen je ukupan broj alela za svaki mikrosatelitski lokus i ispitivanu populaciju svinja. Filogenetska analiza je napravljena pomoću dendextend paketa (Galili, 2015.) te ape paketa (Paradis i sur., 2004.) u programu R 3.4.0. (www.r-project.org/). Neukorijenjeno filogenetsko stablo je konstruirano na osnovi dobivene matrice udaljenosti pomoću neighbour-joining (NJ) metode (Saitou i Nei, 1987.) dok je UPGMA (eng. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) dijagram izrađen metodom po Sokal i Michener-u (1958.). Diskriminantna analiza glavnih komponenti (DAPC) napravljena je pomoću adegenet paketa (Jombart i Ahmed (2011.) u programu R 3.4.0. (www.r-project.org/).

Genetska diferencijacija populacija određena je pomoću STRUCTURE 2.1. programa (Pritchard i sur., 2000) koji se temelji na Markov chain Monte Carlo (MCMC) metodi. Kako

bi odredili vrijednost K, program je pokrenuti 11 puta za K vrijednosti od 2 do 12. Radi postizanja veće točnosti dobivenih podataka program je pokrenut dvostruko. Daljnja obrada rezultata odrađena je programskim paketom Structure Harvester (Dent i vanHoldt, 2012.). Rezultati STRUCTURE programa su vizualizirani pomoću Clumpak software paketa (Kopelman i sur., 2015.).

Vrijednosti vjerojatnosti identiteta (eng. match probability, MP) izračunate su po formuli:

$$MP = (Gx = AiAj|Gy = AiAj) = \frac{2\,[\theta+(1\text{-}\theta)\mathrm{pi}][\theta+(1\text{-}\theta)\mathrm{pj}]}{(1+\theta)(1+2\theta)}$$

gdje je:

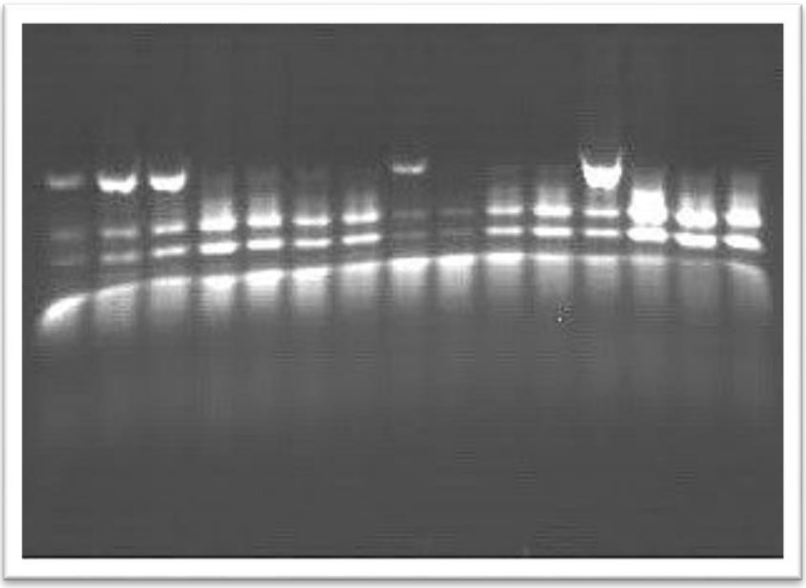
$$Gx, Gy = jedinke\ X, Y$$
$$Gy = jedinka$$
$$\mathrm{pi} = \text{frekvencija alela Ai}$$
$$\mathrm{pj} = \text{frekvencija alela Aj}$$
$$\theta = \text{theta, ekvivalent Fst vrijednosti}$$

prema Weir (1996.) te Arana i sur. (2002.) *ad hoch* napisanom skriptom u programskom paketu R 3.4.0. (www.r-project.org/).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza *MC1R* genotipova

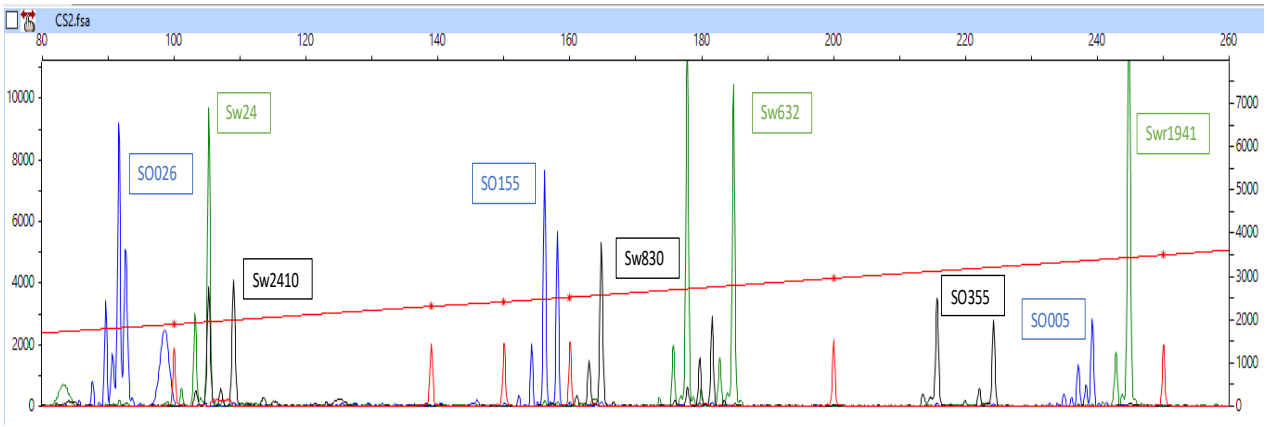
Analizom *MC1R* gena za boju dlake identificiran je *MC1R* genotip kod svinja crne slavonske pasmine. Od ukupno analiziranih 100 svinja rezultati su ukazali na to da je 37 svinja homozigotno po *MC1R* genu, dok su 63 svinje bile heterozigotne. Utvrđena je zastupljenost od 37 % homozigota po *MC1R* genu, te 63 % heterozigota (Slika 11.).



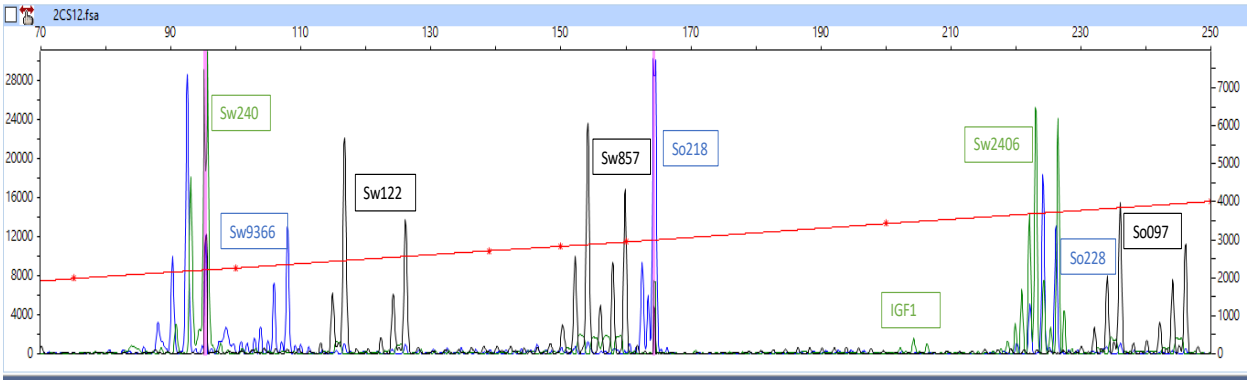
Slika 11. Analizirani uzorci crne slavonske svinje po *MC1R* genu

4.2. Optimizacija združenih reakcija

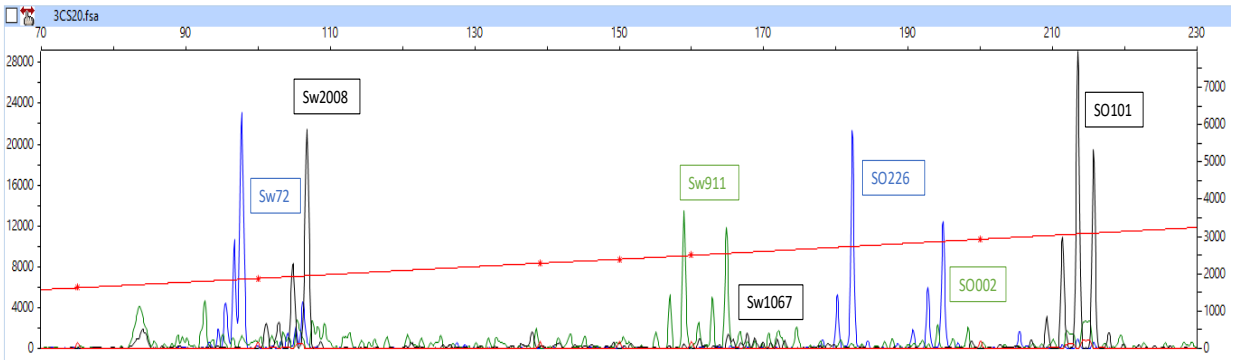
Rezultati optimizacije prve, druge i treće združene reakcije prikazani su .fsa dokumentima. Elektroferogrami su otvarani pomoću Peakscanner i Peak studio programa. Genotipovi istraživanih pasmina (Tablica 10., Tablica 11., Tablica 12.) određivani su izravno iz elektroferograma (Slika 12., Slika 13., Slika 14.).



Slika 12. Genescan analize prve združene reakcije (CS)



Slika 13. Genescan analize druge združene reakcije (CS)



Slika 14. Genescan analize treće združene reakcije (CS)

Vrijednosti na ordinati predstavljaju intenzitet fluorescencije, dok se na apscisi nalaze vrijednosti veličine DNK fragmenata. Slikom je prikazan elektroferogram prve združene reakcije za uzorke crne slavonske svinje dok su elektroferogrami ostalih uzoraka vidljivi u Prilogu 2.

Tablica 10. Vrijednosti MS (bp) dviju skupina crne slavonske pasmine svinja

	S0026	S0155	S0005	Sw24	Sw632	Swr1941	Sw2410	Sw830	S0355	Sw9366	S0218	S0228	sw240	IGF1	Sw2406	Sw122	Sw857	S0097	Sw72	S0226	SO090	Sw911	S0002	Sw2008	Sw1067	S0101
CS1	98	156	230	105	178	246	103	165	216	92	164	224	92	200	223	113	154	222	98	180	243	165	203	107	172	216
CS1	98	160	243	116	180	246	105	181	220	114	164	230	92	202	259	126	158	240	98	188	243	165	209	109	172	216
CS2	90	156	237	105	178	246	105	165	216	100	164	224	92	196	223	119	154	240	106	194	237	155	194	107	172	216
CS2	92	158	239	105	185	246	109	181	224	102	166	224	110	198	230	122	160	244	108	214	241	159	209	107	172	218
CS3	92	146	239	105	178	246	115	162	216	108	166	224	96	196	223	113	154	240	106	182	237	163	198	107	172	216
CS3	98	158	246	112	180	258	115	165	220	114	166	224	96	200	226	128	160	246	106	182	237	163	203	107	174	216
CS4	92	146	239	105	178	246	105	165	207	92	164	224	94	202	223	113	150	240	98	164	225	155	203	100	168	216
CS4	94	158	243	105	180	249	109	165	216	108	164	226	106	204	226	122	154	240	108	212	241	165	231	107	172	216
CS5	92	154	232	105	180	246	111	165	222	94	164	224	96	198	226	119	156	236	98	182	237	159	194	107	172	216
CS5	92	158	235	122	185	249	117	172	224	108	166	240	96	202	230	122	156	242	110	188	241	165	200	107	172	218
CS6	92	146	232	105	180	246	109	167	216	102	164	224	96	202	223	115	154	240	98	188	243	163	207	107	170	216
CS6	92	156	235	105	180	246	109	174	222	114	164	224	106	202	230	119	154	246	106	214	243	165	207	109	172	218
CS7	92	154	229	105	178	246	107	167	216	106	166	224	92	196	223	115	154	210	98	188	227	159	198	107	168	197
CS7	92	156	246	105	180	249	117	174	224	108	166	224	108	204	230	126	158	222	108	214	227	165	200	109	172	197
CS8	92	154	237	105	178	247	105	167	216	108	166	224	92	196	223	126	154	210	98	188	237	159	198	107	172	216
CS8	92	156	246	105	180	249	109	172	222	108	166	224	108	208	230	128	158	210	98	214	243	167	198	107	172	216
CS9	92	146	203	105	178	246	115	165	220	108	166	224	96	200	221	119	154	236	98	180	235	163	198	107	166	216
CS9	98	160	226	105	180	246	115	165	222	108	166	224	96	202	223	122	158	246	106	188	239	165	203	107	180	218
CS10	92	146	220	105	180	246	109	165	224	102	166	224	118	196	223	117	154	210	106	182	237	163	198	109	168	216
CS10	94	160	235	112	180	249	115	180	224	108	166	224	118	208	230	117	154	240	108	212	243	163	198	109	170	218
CS11	94	156	203	105	180	246	109	165	220	102	164	224	104	204	223	117	154	210	98	188	237	159	198	107	172	216
CS11	96	158	239	112	180	246	115	180	224	102	164	224	108	208	226	117	154	240	108	212	241	163	207	109	174	216
CS12	94	156	203	105	180	246	115	165	220	92	164	224	96	204	223	117	154	236	108	182	237	163	198	107	170	216
CS12	96	160	239	105	180	249	115	165	224	108	164	226	96	206	226	126	160	246	108	204	241	165	207	107	174	216
CS13	92	146	220	105	178	246	115	165	216	102	166	224	96	198	223	117	154	240	98	182	241	159	198	107	168	218
CS13	98	156	239	112	190	246	115	182	216	108	166	224	106	198	223	119	154	246	106	212	243	165	198	109	172	218
CS14	92	156	233	105	180	246	105	165	220	102	164	220	106	204	226	117	156	210	98	194	241	159	198	107	168	214
CS14	92	156	244	105	190	246	115	165	224	106	166	224	110	206	258	119	158	222	98	204	247	159	207	109	172	216
CS15	92	158	244	105	178	246	105	165	224	108	164	224	108	196	221	115	154	240	108	182	243	155	198	107	168	216
CS15	98	160	244	112	180	249	115	165	224	108	164	224	114	196	223	126	154	246	108	194	243	163	207	107	172	216
CS16	92	154	239	105	178	246	105	165	224	92	166	224	96	196	223	113	154	222	98	194	243	159	198	107	168	214
CS16	92	156	239	105	180	246	115	165	224	102	166	224	108	200	230	119	158	244	98	204	243	159	207	109	172	216
CS17	92	146	230	105	178	246	105	165	220	92	164	224	108	200	223	113	146	210	98	182	241	163	200	107	172	216
CS17	92	156	244	105	180	246	109	174	224	108	166	224	108	210	230	117	156	240	108	194	243	165	200	109	172	218
CS18	92	146	220	105	180	246	115	180	224	102	166	224	106	200	223	113	154	240	98	182	247	163	198	107	168	216
CS18	92	146	235	105	190	246	115	180	224	108	166	224	106	202	223	117	154	242	106	212	247	165	207	109	172	218
CS19	96	156	202	105	180	246	109	165	220	92	164	224	96	202	224	117	156	236	108	188	237	159	198	107	170	216
CS19	96	156	239	105	180	249	115	165	224	108	164	224	96	206	226	126	160	240	108	212	243	163	207	107	174	216
CS20	96	146	220	105	180	246	109	180	222	102	164	224	110	196	223	119	154	236	98	182	241	159	194	107	168	214
CS20	98	160	239	105	180	258	115	180	224	108	164	224	114	204	226	126	156	246	106	194	243	165	198	107	172	216
CS21	92	146	202	112	180	246	109	165	216	108	166	224	106	200	223	113	154	234	98	182	241	159	194	107	168	216
CS21	98	146	239	116	190	249	115	165	228	108	166	224	108	202	226	117	154	244	106	212	243	165	198	107	172	218
CS22	92	146	226	116	178	246	115	180	216	92	164	224	96	196	221	122	146	210	108	182	233	159	200	107	170	216
CS22	98	156	233	116	180	246	121	180	222	108	164	224	106	210	223	126	154	240	108	188	243	165	200	109	172	218
CS23	94	146	202	112	180	246	115	165	216	108	166	224	96	192	223	117	154	210	98	212	243	159	188	107	172	210

CS23	98	146	235	105	180	249	115	180	216	108	166	224	108	210	226	117	154	236	106	212	257	159	198	109	172	218
CS24	94	146	202	112	180	246	115	165	216	108	166	222	96	200	223	113	154	236	98	182	243	155	200	107	172	210
CS24	98	146	220	105	190	246	121	180	216	108	166	224	106	208	223	117	156	244	106	204	243	163	200	107	172	216
CS25	92	146	229	105	178	246	105	165	216	94	164	224	114	206	223	113	156	222	106	180	243	159	194	107	162	216
CS25	92	156	239	105	180	246	115	182	222	108	164	224	114	208	223	113	156	240	108	182	243	159	209	109	172	218
CS26	92	146	231	105	178	246	115	163	222	102	164	224	96	194	230	117	154	210	98	194	241	159	198	107	172	218
CS26	92	146	235	112	180	246	115	165	224	108	164	224	108	210	230	117	156	246	98	194	243	165	207	109	172	218
CS27	92	156	229	105	180	246	109	165	216	102	166	224	94	192	223	113	146	210	98	180	237	159	194	107	166	216
CS27	98	156	239	112	180	246	115	180	224	108	166	224	114	210	226	113	154	240	106	212	243	163	207	109	172	218
CS28	94	146	243	105	178	246	105	165	216	94	164	24	96	200	230	115	156	210	98	188	235	159	203	107	168	210
CS28	94	146	243	116	178	246	109	165	216	102	164	224	106	200	230	128	160	246	98	194	241	165	203	107	172	218
CS29	92	160	243	105	180	249	105	165	220	92	164	224	96	196	223	122	146	210	98	182	237	163	194	107	170	216
CS29	96	160	243	105	190	249	115	165	224	108	164	224	106	210	223	126	154	240	98	204	241	165	198	107	170	216
CS30	92	146	235	105	178	246	105	165	216	108	164	224	96	196	223	122	154	238	98	194	237	163	194	107	168	216
CS30	98	160	243	105	185	249	115	172	220	108	166	240	110	200	223	126	156	240	108	204	241	165	194	107	172	218
CSX1	98	146	205	116	180	246	103	167	222	102	164	224	108	198	226	117	150	236	98	182	241	155	194	107	162	216
CSX1	98	159	221	121	182	250	111	174	226	114	166	224	110	198	226	122	154	240	106	194	241	159	207	107	180	218
CSX2	96	159	232	106	180	246	109	165	222	92	164	224	96	202	223	113	156	240	106	194	237	159	194	107	170	216
CSX2	98	159	241	106	180	259	115	182	226	108	164	224	108	202	223	122	160	242	106	212	241	165	198	107	170	218
CSX3	96	159	221	106	180	246	115	163	226	108	164	224	96	196	226	119	154	240	98	212	243	165	198	107	172	216
CSX3	98	161	232	112	180	246	115	165	226	108	164	224	106	202	230	126	156	246	98	212	243	165	207	107	172	218
CSX4	92	155	203	106	180	246	111	165	218	108	164	224	96	200	226	119	156	222	98	180	237	159	198	107	172	218
CSX4	98	161	236	106	180	246	115	167	226	108	166	240	110	204	254	122	156	236	106	194	243	163	200	107	172	220
CSX5	92	157	230	106	178	246	109	165	222	108	164	224	96	196	223	113	150	210	98	182	243	159	207	109	172	196
CSX5	94	161	241	112	180	246	115	174	226	108	166	230	108	204	230	126	156	236	106	212	243	165	207	111	172	218
CSX6	96	155	203	106	178	246	115	165	218	94	164	224	96	198	221	113	156	234	98	194	137	163	200	107	172	216
CSX6	96	161	245	106	180	250	121	165	222	108	164	240	96	198	223	122	156	236	108	212	241	165	209	107	172	218
CSX7	92	157	203	106	178	246	111	174	218	94	164	224	96	198	223	113	150	210	106	188	237	163	194	107	172	216
CSX7	98	159	239	112	185	246	115	180	226	94	166	240	108	202	230	122	156	236	110	214	243	165	194	111	172	218
CSX8	96	159	235	106	180	246	105	174	222	102	164	222	96	196	226	126	154	240	106	194	241	163	194	107	172	216
CSX8	96	161	241	106	191	246	109	180	226	108	164	224	96	210	230	126	156	240	108	204	249	165	198	107	172	216
CSX9	92	146	232	106	180	246	109	163	222	102	164	224	108	194	226	126	156	210	106	194	241	159	198	107	168	216
CSX9	98	161	236	106	180	246	115	180	226	108	164	224	108	210	230	128	156	236	106	194	241	163	198	107	174	218
CSX10	92	146	221	106	178	246	115	165	226	108	166	224	96	202	223	115	154	242	106	182	243	163	198	107	172	210
CSX10	96	157	221	106	180	259	115	180	226	108	166	242	96	202	254	126	158	246	106	212	243	165	198	109	172	216
CSX11	92	159	241	106	178	246	105	165	218	108	164	224	108	196	223	115	154	240	98	188	243	167	194	107	172	220
CSX11	98	159	247	106	180	246	117	180	226	114	164	224	108	196	226	126	160	240	106	204	245	167	200	109	172	220
CSX12	94	146	203	106	180	246	103	165	222	102	164	224	96	192	226	119	156	246	98	182	233	163	203	107	176	212
CSX12	96	157	214	106	180	246	109	174	226	108	164	230	110	204	226	122	158	246	98	188	237	165	203	107	176	216
CSX13	92	146	236	106	180	246	109	180	226	102	164	224	106	200	223	117	154	240	106	194	237	163	198	107	168	210
CSX13	98	161	247	112	180	246	115	182	226	108	166	224	106	200	223	122	160	246	106	212	243	165	198	109	168	216
CSX14	92	159	239	106	178	246	115	174	226	108	164	224	92	200	223	119	156	236	98	182	233	159	198	107	172	216
CSX14	92	161	245	112	178	246	125	174	226	110	164	224	110	200	223	119	156	240	98	194	241	165	207	109	172	216
CSX15	92	146	241	106	180	246	105	165	226	108	164	224	110	204	226	117	154	210	98	182	243	155	198	107	162	216
CSX15	96	157	241	106	180	259	109	165	226	108	166	224	114	204	258	126	160	246	108	204	249	159	198	109	172	216
CSX16	92	157	236	106	180	246	115	165	224	94	164	222	104	196	226	122	156	210	108	182	243	163	200	107	166	218
CSX16	92	159	236	122	180	246	115	180	230	108	164	224	108	210	226	126	156	246	108	214	243	165	209	109	172	218
CSX17	92	146	221	106	178	246	101	165	226	92	164	224	90	200	223	122	156	210	98	182	243	163	198	107	172	216
CSX17	92	157	245	106	180	246	105	165	226	108	164	224	108	204	226	126	156	222	108	182	243	165	198	109	172	218
CSX18	92	146	221	106	180	246	109	165	218	108	164	224	96	196	223	117	154	242	106	182	243	159	194	107	168	218

CSX18	94	161	241	106	180	246	115	180	226	108	164	224	106	204	223	126	160	246	106	194	243	165	198	107	172	218
CSX19	92	146	232	106	178	246	105	165	224	92	166	224	90	202	223	115	154	222	98	182	241	163	198	107	168	216
CSX19	92	146	241	106	180	246	109	165	226	92	166	224	108	210	226	126	156	240	106	194	243	165	207	107	172	218
CSX20	92	146	221	106	180	246	109	165	218	94	166	224	106	200	223	115	154	222	98	182	241	165	207	107	168	216
CSX20	98	146	241	116	191	250	121	165	230	108	166	224	110	200	226	122	156	244	106	194	241	165	207	107	168	218

Tablica 11. Vrijednosti MS (bp) pasmina durok, veliki jorkšir i landras

	S0026	S0155	S0005	Sw24	Sw632	Swr1941	Sw2410	Sw830	S0355	Sw9366	S0218	S0228	sw240	IGF1	Sw2406	Sw122	Sw857	S0097	Sw72	S0226	SO090	Sw911	S0002	Sw2008	Sw1067	S0101
D1	92	152	248	106	180	244	109	167	216	108	164	224	94	198	223	117	160	238	98	180	237	155	203	107	168	216
D1	96	152	268	116	180	246	109	172	224	108	164	230	108	206	230	117	162	240	110	180	237	159	207	109	174	216
D2	92	152	248	106	180	244	109	172	228	108	164	224	94	198	223	117	156	210	98	180	237	155	198	107	174	216
D2	102	152	266	116	180	244	121	172	228	108	168	230	94	198	255	124	156	210	108	180	237	155	216	107	174	216
D3	96	152	246	106	180	244	105	167	228	108	164	224	96	198	223	115	154	240	98	180	237	155	188	107	168	216
D3	96	152	248	116	180	246	125	172	228	108	164	230	108	198	228	115	162	240	110	180	237	159	198	109	174	216
D4	98	152	248	106	180	244	109	172	224	108	164	230	92	198	223	117	156	238	98	180	237	155	198	109	174	216
D4	102	152	268	116	180	244	121	172	224	110	168	230	108	198	255	124	156	240	98	180	237	159	203	109	174	216
D5	92	152	266	106	180	244	109	172	224	108	164	224	96	198	230	117	156	210	98	180	237	155	198	107	174	216
D5	96	152	268	106	180	244	115	172	228	110	168	230	96	202	255	124	160	210	108	180	237	159	198	109	174	216
J1	92	156	244	106	178	268	115	165	216	110	164	224	96	188	223	113	154	240	100	182	241	155	188	109	172	216
J1	98	158	246	106	180	270	115	167	220	110	164	242	96	188	223	117	154	240	106	194	241	161	198	109	172	216
J2	92	156	202	106	180	244	109	167	224	108	164	226	96	-9	223	113	146	240	106	182	241	155	188	111	162	216
J2	98	158	244	106	180	270	121	167	224	110	164	242	96	-9	223	122	162	240	106	194	241	165	198	111	176	216
J3	96	144	244	106	178	258	117	165	220	94	164	226	112	186	223	117	162	210	106	182	237	155	198	107	162	216
J3	98	158	246	120	180	270	121	165	224	94	164	242	112	188	223	117	162	240	108	194	237	161	207	109	172	218
J4	98	146	202	106	180	258	115	165	220	92	164	224	94	-9	223	117	162	240	106	194	237	165	207	107	162	216
J4	98	158	202	120	180	270	115	176	224	108	164	240	94	-9	230	117	162	246	108	196	237	167	207	109	172	218
J5	92	156	202	120	180	248	115	165	222	94	164	226	112	-9	236	117	146	210	108	182	237	155	198	109	162	216
J5	92	156	234	120	184	270	115	172	224	110	164	242	112	-9	236	122	154	240	108	182	247	165	198	109	172	216
J6	98	156	244	106	180	270	117	165	216	94	164	226	96	-9	223	113	154	240	106	182	241	155	198	109	162	216
J6	98	158	246	106	180	270	121	167	224	110	164	242	96	-9	223	122	154	240	106	194	241	165	198	111	176	216
J7	92	146	202	106	180	244	115	172	220	110	162	220	112	-9	223	122	154	210	108	182	241	159	198	109	162	200
J7	98	158	244	120	180	244	121	176	224	110	166	224	112	-9	223	122	162	246	108	194	241	165	207	109	172	216
J8	98	146	222	106	180	246	121	165	220	110	166	240	96	-9	223	117	154	210	100	182	245	159	194	107	172	216
J8	98	156	236	106	190	250	121	176	224	110	166	242	96	-9	236	122	158	246	108	202	245	165	198	109	172	216
J9	92	146	244	106	180	244	109	165	214	94	164	230	96	202	230	124	154	222	106	180	243	155	207	107	162	216
J9	94	156	244	122	182	244	115	172	224	108	164	242	96	202	236	126	156	246	108	194	243	159	207	107	172	218
J10	92	146	232	106	180	244	115	165	224	110	164	224	90	-9	223	122	146	222	98	182	241	155	209	107	162	218
J10	94	160	244	106	182	244	121	167	224	110	164	240	94	-9	236	124	154	244	108	194	241	155	209	107	172	218
L1	92	146	218	106	178	244	101	165	220	94	164	224	96	204	221	113	156	222	108	180	241	155	207	107	162	216
L1	94	156	244	116	178	244	109	174	228	110	164	224	106	208	223	124	156	240	114	182	241	159	209	109	168	216
L2	92	146	218	106	200	244	103	174	224	94	164	230	92	198	223	115	154	210	108	180	239	155	209	107	154	216
L2	94	156	244	106	204	244	117	174	224	110	164	230	112	202	257	117	154	240	108	182	243	155	209	107	154	218

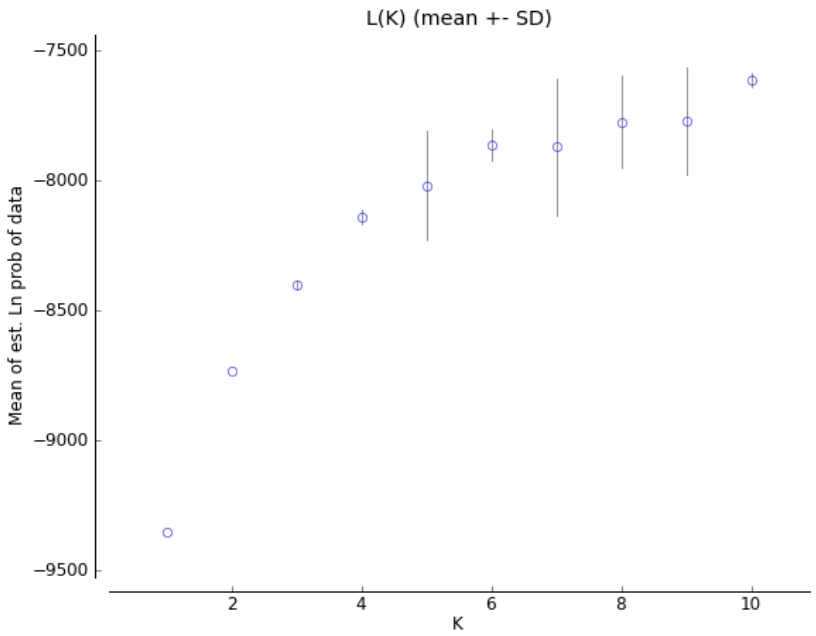
L3	92	156	218	106	178	244	109	165	216	108	164	224	96	198	223	113	146	222	98	180	239	155	207	107	162	216
L3	92	158	232	116	182	270	117	174	220	108	164	224	112	198	232	124	152	240	108	182	243	159	207	109	180	216
L4	94	154	218	106	180	244	101	167	224	94	164	230	92	198	223	113	146	210	98	182	243	155	207	107	154	216
L4	98	156	240	106	204	244	117	174	224	110	164	230	110	200	228	115	154	246	108	182	243	155	207	107	154	218
L5	94	156	218	116	180	244	101	167	220	94	164	224	110	196	223	124	146	210	98	180	241	155	207	107	162	216
L5	98	156	244	116	200	248	109	167	224	94	164	224	112	198	223	124	156	246	108	180	241	155	209	107	168	218

Tablica 12. Vrijednosti MS (bp) pasmina PIC, pietrain i topigs

	S0026	S0155	S0005	Sw24	Sw632	Swr1941	Sw2410	Sw830	S0355	Sw9366	S0218	S0228	sw240	IGF1	Sw2406	Sw122	Sw857	S0097	Sw72	S0226	SO090	Sw911	S0002	Sw2008	Sw1067	S0101
PIC1	88	146	244	100	180	246	101	165	210	94	164	220	90	198	223	113	146	240	98	182	237	159	198	107	162	214
PIC1	92	160	246	100	186	250	113	174	224	110	164	224	90	198	236	122	156	244	98	182	245	167	198	107	172	218
PIC2	92	146	232	106	178	246	109	172	224	102	164	220	90	198	223	117	146	240	108	180	237	155	207	101	168	218
PIC2	96	160	250	120	178	246	115	172	230	108	164	226	96	202	226	117	154	246	110	202	237	163	209	109	168	218
PIC3	92	158	240	106	180	262	103	172	216	108	164	224	96	198	223	117	146	210	98	182	237	155	207	107	168	200
PIC3	96	158	242	106	180	272	115	172	222	114	164	226	96	206	236	122	160	244	108	194	241	167	207	107	174	218
PIC4	94	146	232	106	180	246	109	172	210	110	164	220	96	200	223	124	146	210	98	180	241	153	207	107	156	216
PIC4	96	154	234	106	186	246	117	182	224	114	166	224	96	204	223	124	154	222	114	194	241	167	209	111	162	216
PIC5	88	152	202	100	178	246	99	182	214	110	164	220	96	198	236	120	152	210	98	180	237	159	198	109	172	216
PIC5	94	158	228	100	184	246	113	182	224	110	166	230	96	200	236	122	154	240	110	182	243	167	207	109	174	218
PIC6	92	158	240	106	178	246	117	172	224	110	164	220	90	202	223	122	154	210	98	194	237	153	198	109	168	214
PIC6	96	158	250	120	178	246	125	172	226	110	164	224	96	204	223	122	156	210	106	194	241	155	198	111	174	216
PIC7	92	156	234	106	180	246	109	172	230	108	166	224	96	200	223	120	154	210	108	182	237	159	209	107	168	214
PIC7	92	158	248	116	180	246	117	174	230	110	166	224	96	210	226	122	156	210	110	194	237	167	209	109	174	216
PIC8	92	152	238	120	180	246	115	167	224	102	164	220	96	198	223	117	154	210	98	194	237	155	198	107	168	216
PIC8	98	160	254	122	180	246	125	167	226	114	164	224	112	202	236	124	156	240	106	194	241	167	198	109	168	216
PIC9	92	156	238	106	178	246	101	172	224	108	164	220	98	198	223	117	154	210	98	182	237	159	194	109	162	216
PIC9	98	158	246	106	180	246	109	182	224	108	164	224	123	206	236	124	156	240	98	202	241	163	198	111	168	216
PIC10	96	146	240	106	180	262	117	165	216	92	164	220	90	196	223	117	146	210	108	182	237	159	198	107	168	214
PIC10	96	158	240	106	180	272	125	174	226	114	166	224	96	210	223	124	160	222	108	182	237	167	198	111	168	216
PIC11	92	158	244	106	180	246	115	174	222	108	164	220	90	198	223	122	146	210	106	194	237	159	194	109	162	216
PIC11	96	158	250	116	180	246	125	174	226	110	164	224	96	202	236	122	154	210	110	202	241	163	207	109	172	218
PIC12	92	158	226	100	178	246	111	174	226	102	164	220	112	196	223	117	146	210	98	202	237	155	198	109	162	214
PIC12	94	158	240	100	178	262	117	174	226	108	164	226	123	202	223	120	154	222	98	202	243	167	209	109	168	214
PIC13	96	156	240	106	178	246	103	165	224	102	164	224	96	198	223	117	146	240	98	180	237	159	194	111	174	220
PIC13	96	160	240	120	180	250	115	174	226	108	164	226	96	198	236	120	160	240	110	182	237	163	198	111	176	220
PIC14	92	158	234	106	180	246	109	172	224	108	164	220	96	200	223	117	154	210	98	180	237	165	198	109	168	214
PIC14	96	158	234	120	180	272	117	172	226	114	164	230	96	200	223	122	156	210	98	202	237	167	198	111	168	216
PIC15	92	156	250	106	180	246	101	172	216	110	164	226	96	202	223	122	154	210	98	180	237	155	198	109	168	214
PIC15	96	158	270	106	180	246	117	172	226	114	164	226	123	202	236	122	156	240	108	202	237	167	198	111	174	216
P1	92	154	218	106	178	246	109	167	222	94	164	220	92	202	223	124	150	210	98	182	243	155	198	107	158	218
P1	98	160	238	106	190	246	117	167	226	94	164	242	106	204	223	124	154	240	106	182	245	165	198	107	158	218
P2	92	146	218	106	178	246	107	167	210	96	164	242	92	194	223	124	150	210	98	182	237	155	198	107	158	216

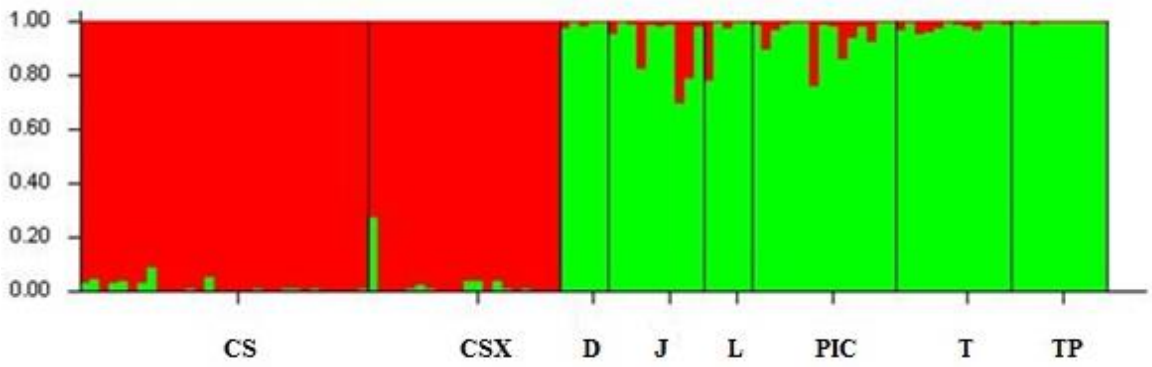
P2	92	160	238	114	182	246	117	167	222	110	164	242	94	198	223	124	150	236	98	182	241	165	198	107	162	218
P3	92	160	236	106	178	260	103	172	216	110	166	242	96	204	223	124	150	210	98	182	243	155	188	107	170	218
P3	94	160	246	114	180	272	117	182	226	110	166	242	108	204	223	124	156	236	98	194	245	155	209	111	170	218
P4	92	146	240	106	178	259	103	167	210	110	166	224	108	198	223	113	150	210	98	182	237	155	188	107	176	216
P4	92	160	246	106	180	272	109	182	216	114	166	224	110	204	223	124	156	210	98	194	243	155	198	107	178	216
P5	92	154	218	106	182	246	109	167	222	108	166	220	92	196	223	124	150	210	98	182	243	155	198	107	158	216
P5	96	160	232	106	186	246	117	182	226	110	166	224	108	198	242	124	154	244	98	182	243	155	198	107	158	216
P6	96	160	234	106	180	246	109	182	216	94	164	220	96	198	223	113	154	210	98	182	243	155	188	107	158	218
P6	98	160	236	106	180	272	117	182	226	94	164	220	96	198	223	124	158	210	98	194	245	155	209	111	158	218
P7	92	160	204	114	178	250	109	167	226	108	164	220	96	200	223	124	154	236	98	182	243	155	188	107	158	216
P7	94	160	234	114	186	272	117	167	226	114	164	242	110	204	223	124	156	244	98	202	245	159	188	111	158	218
P8	92	146	234	106	180	246	103	172	226	108	164	224	96	198	223	113	150	210	98	182	243	155	188	107	178	216
P8	96	160	238	106	186	272	117	176	226	108	164	224	108	198	223	113	154	240	98	182	243	159	198	107	178	218
P9	96	158	238	106	178	246	107	172	210	102	166	224	96	202	223	113	154	210	98	182	243	155	188	107	174	216
P9	96	160	238	114	186	250	117	182	216	114	166	224	108	202	223	124	158	210	106	182	243	159	209	107	178	218
P10	92	158	236	106	186	246	107	172	226	96	164	220	92	198	223	124	154	210	98	182	243	155	188	107	158	216
P10	96	160	238	106	186	250	117	172	226	110	164	226	108	198	223	124	156	210	98	182	245	155	188	111	162	218
P11	96	158	202	104	182	250	109	172	216	96	164	220	92	202	223	124	154	240	98	182	237	155	198	107	158	216
P11	96	160	218	106	182	272	117	182	222	108	164	242	96	202	223	124	154	240	98	182	243	159	198	107	162	218
P12	92	146	202	106	186	246	107	167	224	108	164	220	96	196	223	124	154	240	98	182	245	155	188	107	158	218
P12	92	154	244	116	186	250	117	176	226	114	164	224	96	202	223	124	162	240	98	182	249	159	188	107	162	218
TP1	98	146	236	106	180	244	121	163	224	106	164	222	96	198	236	117	162	244	98	194	245	155	207	107	162	216
TP1	98	156	244	120	180	248	125	172	224	110	164	242	96	198	236	117	162	248	98	194	247	159	209	111	172	218
TP2	92	156	202	106	178	244	121	163	222	102	164	222	96	202	223	117	158	236	98	194	237	155	198	107	174	218
TP2	98	156	236	106	184	248	121	172	224	106	164	242	96	202	236	117	162	244	98	194	243	165	207	107	176	220
TP3	92	156	236	106	180	244	121	163	214	92	164	222	92	198	223	117	156	210	98	194	245	155	194	107	168	218
TP3	92	158	236	120	184	250	125	174	224	108	164	222	96	202	223	122	156	236	108	196	245	159	207	111	172	220
TP4	98	156	234	106	180	244	115	163	214	92	164	242	90	198	223	117	162	246	98	194	237	155	209	107	174	218
TP4	98	156	236	120	190	244	121	172	224	110	164	242	96	198	236	117	162	248	106	194	243	155	209	111	176	220
TP5	98	146	236	106	180	246	121	163	224	106	164	222	96	192	236	117	158	244	98	194	241	155	207	107	162	216
TP5	98	156	244	120	180	248	125	172	224	110	164	242	96	198	236	117	162	248	98	194	245	159	209	111	172	218
TP6	98	146	236	106	180	246	121	163	224	106	164	222	96	198	236	117	158	244	98	194	245	155	207	107	162	216
TP6	98	156	244	120	180	248	125	172	224	110	164	242	96	202	236	117	162	248	98	194	245	159	209	111	172	218
TP7	98	156	234	106	180	244	115	163	214	92	164	242	90	198	223	117	162	246	98	194	237	155	209	107	176	218
TP7	98	156	236	120	190	244	121	172	224	110	164	242	96	204	236	117	162	248	106	194	237	155	209	111	176	220

4.3. Analiza strukture populacija



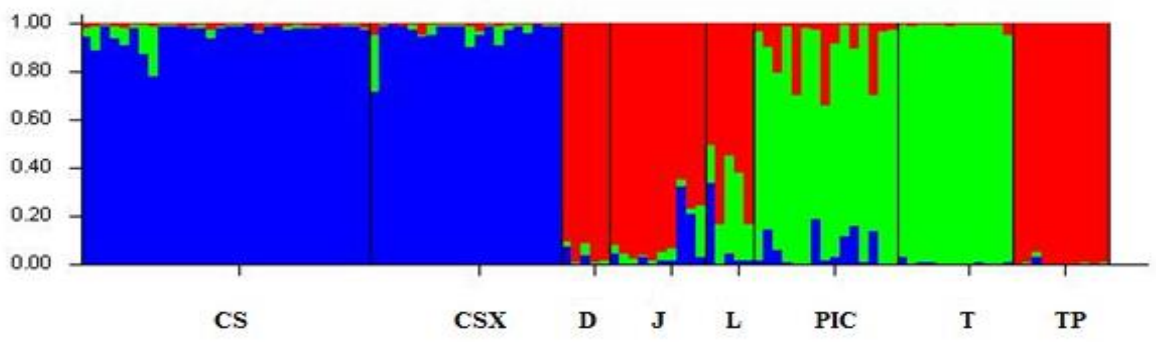
Graf 1. Određivanje broja genetskih klastera K temeljem Evanno metode (2005.)

Grafički prikaz rezultata strukturalne analize koji su korišteni za određivanje stvarnog broja genetskih klastera, K=8, prikazan je Grafom 1. Metoda određivanja broja klastera K po Evannu i sur. (2005.) temelji se na pronalaženju prekida logaritamske distribucije lnP(D) za različite K vrijednosti. K je broj pretpostavljenih genetskih klastera, dok je lnP(D) procjena *a posterior* vjerojatnosti za predloženi K.



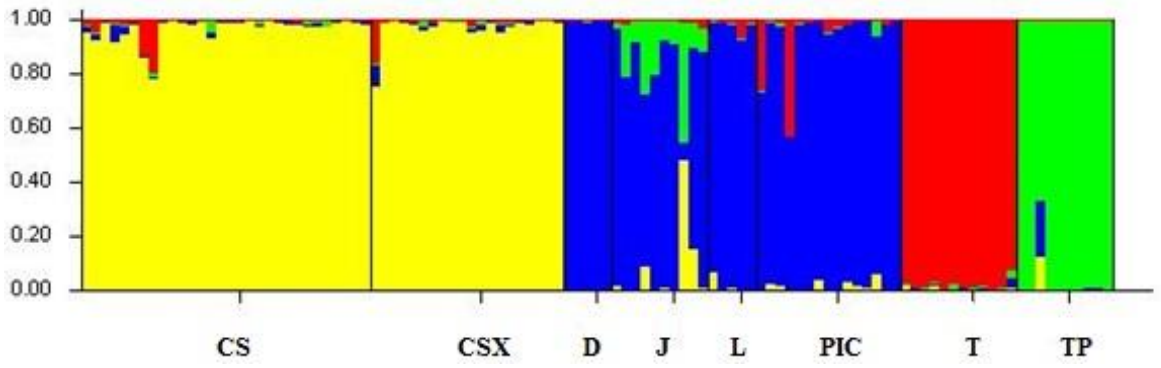
Slika 15. Rezultati STRUCTURE analize, K=2

Slika 15. prikazuje rezultate dobivene STRUCTURE programskim paketom uz pretpostavku postojanja dvije populacije analiziranih svinja. Vidljivo je grupiranje svinja u dva klastera. Dvije skupine crnih slavonskih svinja su grupirane u jedan zajednički genetski klaster dok su ostale pasmine smještene u drugi klaster. Analizom je utvrđeno da crne slavonske svinje čine 98,4 % prvog klastera, dok je preostalih 1,6 % udio pasmina koje su jednim dijelom križanci crnih slavonskih svinja.



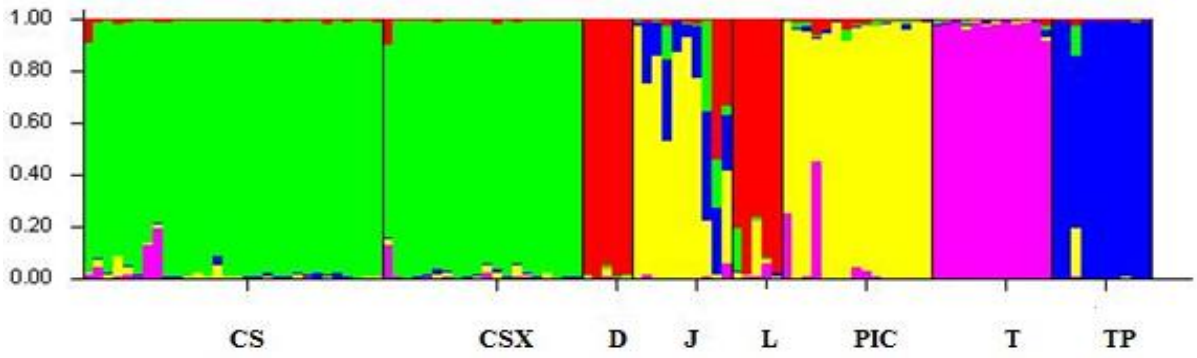
Slika 16. Rezultati STRUCTURE analize, K=3

Slika 16. prikazuje rezultate analize dobivene uz pretpostavku postojanja tri populacije svinja. I dalje su u istom klasteru grupirane dvije skupine crnih slavonskih svinja. Drugi klaster čine pasmine durok, veliki jorkšir, landras i dijelom PIC svinje, dok su u trećem klasteru grupirane pasmine pietrain i topigs. Udio crnih svinja u prvom klasteru iznosi 97,4 % dok su po 1,3 % udjeli druga dva klastera, tj. pasmina koje su grupirane u njima.



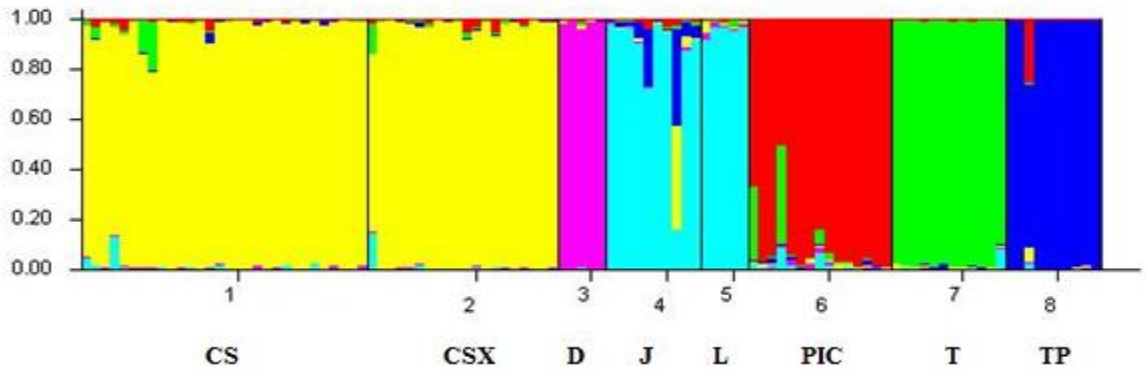
Slika 17. Rezultati STRUCTURE analize, K=4

Slika 17. prikazuje rezultate STRUCTURE analize uz pretpostavku postojanja četiri populacije svinje. U prvom klasteru su grupirane dvije skupine crnih slavonskih svinja s udjelom od 96,6 %, 1,7 % čine svinje iz trećeg klastera, tj. pietrain pasmina, 0,11 % su pasmine svinja iz drugog klastera, a 0,6 % su topigs svinje koje su grupirane u četvrtom klasteru. Drugi klaster čine pasmine durok, veliki jorkšir, landras i PIC.



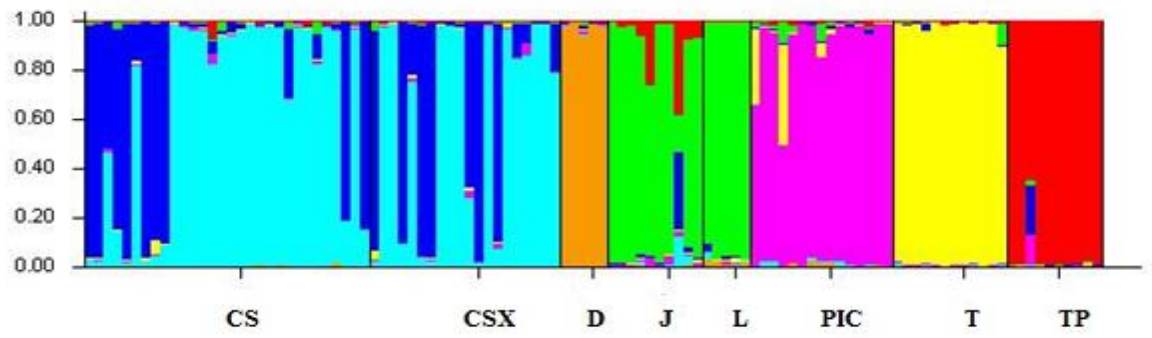
Slika 18. Rezultati STRUCTURE analize, K=5

Slika 18. prikazuje rezultate STRUCTURE analize uz pretpostavku postojanja pet populacija svinja. Prvi klaster čine dvije skupine crnih slavonskih svinja. Crne slavonske svinje čine 96,3 %. U drugom klasteru su grupirane pasmine durok i landras, dok treći klaster čine veliki jorkšir i PIC svinje. Pietrain pasmina je grupirana u četvrtom klasteru, dok je topigs u petom. Zadnja dva klastera su vidljiva i formirana već pri analizi s pretpostavkom postojanja 4 populacije svinja.



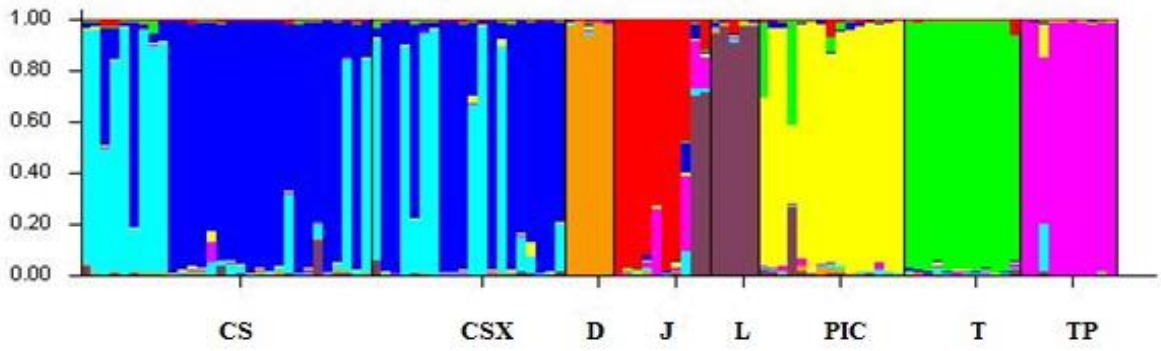
Slika 19. Rezultati STRUCTURE analize, K=6

Slikom 19. su predstavljeni rezultati analize strukture populacije uz pretpostavku postojanja šest populacija svinja. U prvom klasteru je i dalje vidljivo zajedničko grupiranje dviju skupina crnih slavonskih svinja. Nadalje, u ovom dijelu analize je došlo do razdvajanja durok pasmine u zasebni klaster. Veliki jorkšir i landras su grupirani u treći klaster dok su PIC svinje odvojene u četvrti genetski klaster. Pietrain pasmina se nalazi u petom klasteru dok je u šestom klasteru grupiran topigs.



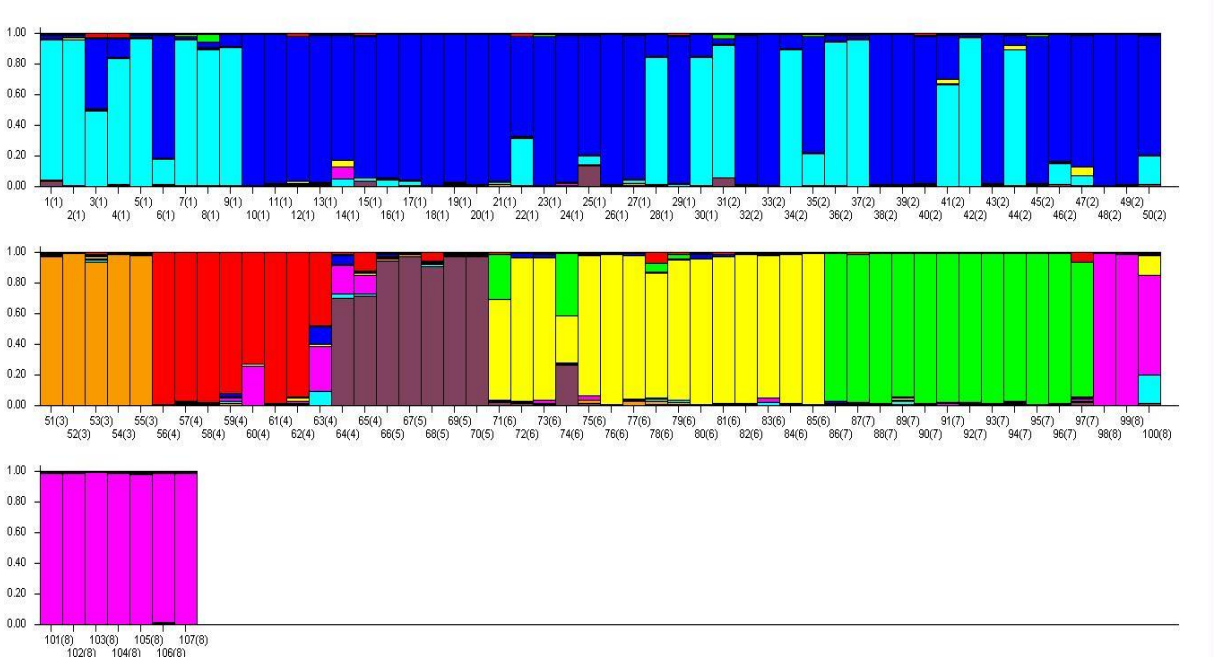
Slika 20. Rezultati STRUCTURE analize, K=7

Slika 20. prikazuje rezultate STRUCTURE analize uz pretpostavku postojanja sedam populacija svinja. Vidljivo je razdvajanje crnih slavonskih svinja za koje je utvrđeno da su homozigoti po *MC1R* genu od heterozigota križanaca, no i dalje su grupirani u jednom zajedničkom klasteru. Durok, PIC, pietrain i topigs se nalaze u zasebnim klasterima, dok su veliki jorkšir i landras i dalje grupirani zajedno u četvrtom klasteru.



Slika 21. Rezultati STRUCTURE analize, K=8

Slika 21. prikazuje rezultate STRUCTURE analize uz pretpostavku postojanja osam populacija svinja. Jasno je grupiranje analiziranih pasmina svinja u odvojene klastere. Populacija crne slavonske svinje se sastoji od dviju skupina za koje se jasno uočava pripadnost pojedinom genetskom klasteru.

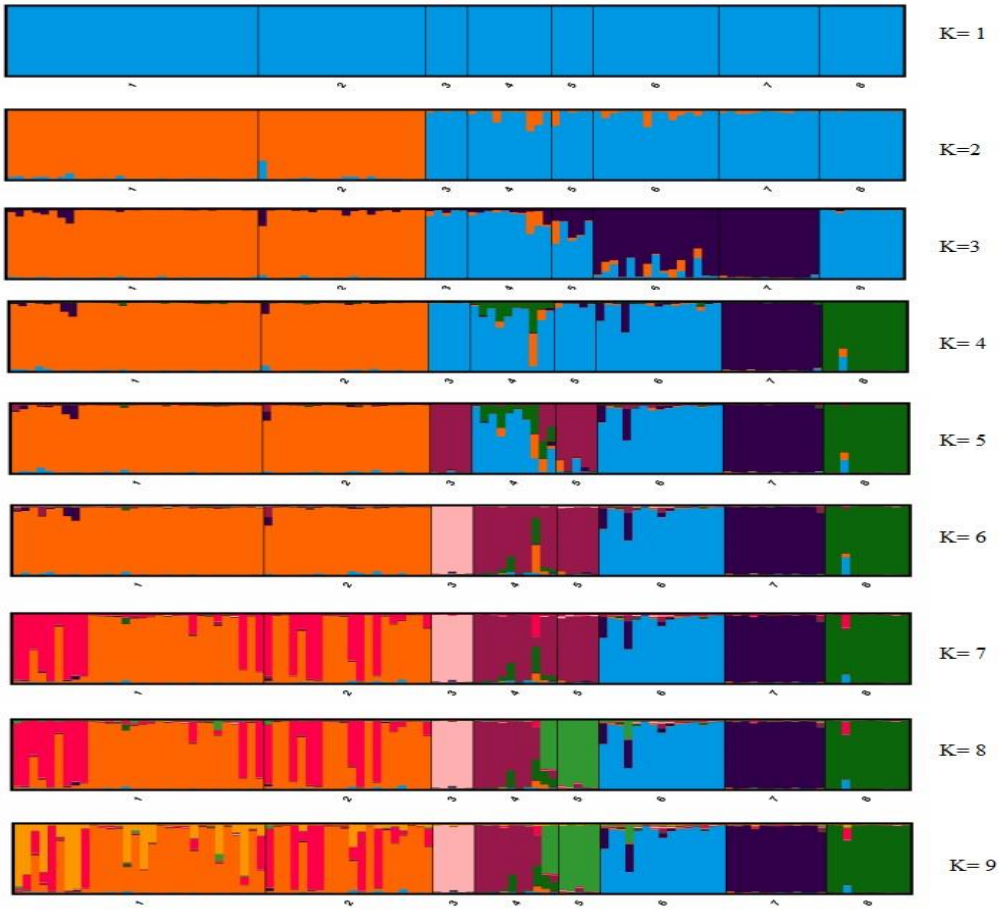


Slika 22. Analiza strukture populacija uz K=8 uz prikaz svake analizirane jedinke u populacijama

Na Slici 22. je prikazana analiza strukture populacija prema jedinkama u svakoj od osam analiziranih populacija svinja te udio pojedinih pasmina svinja u svakoj jedinki.

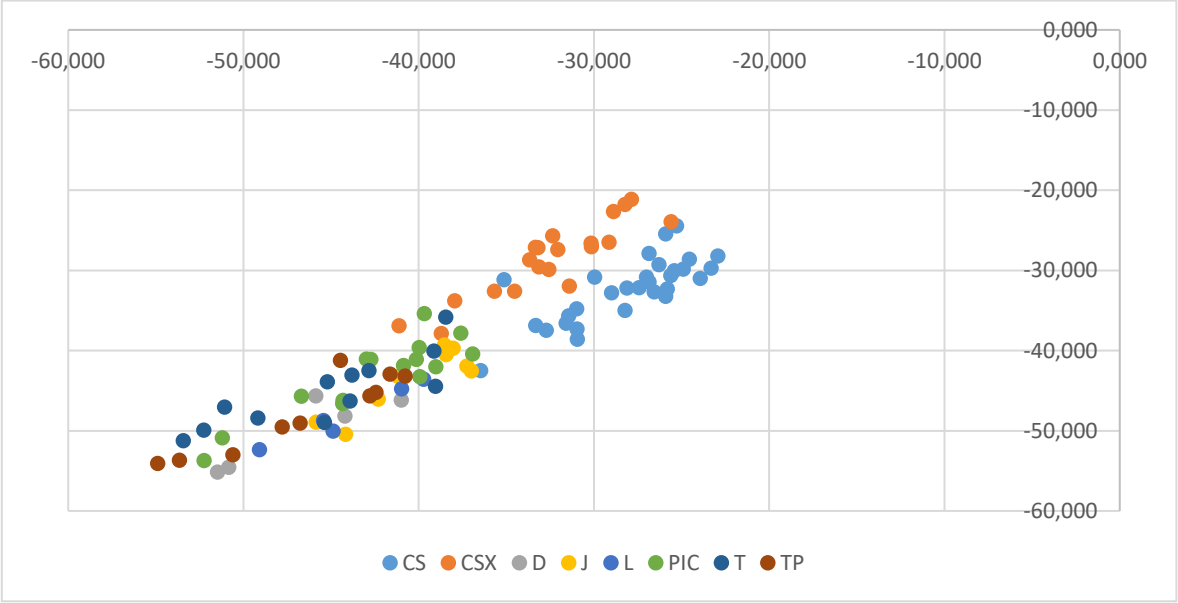
Na osnovi analize genetske strukture populacija pomoću različitih programskih paketa jasno se vidi diferencijacija analiziranih pasmina svinja u osam genetskih klastera, tj. pasmina, koje su ujedno i bile uključene u istraživanje (crna slavonska svinja (CS), crna slavonska svinja (CSX), durok (D), landras (L), pietrain (P), PIC (PIC), topigs (TP) i veliki jorkšir (J)). STRUCTURE analiza je otkrila najvišu razinu diferencijacije na način da je u početnoj analizi koja je uključivala 107 uzoraka, analiza naznačila postojanje 8 genetskih klastera. Početnom analizom je bilo jasno kako je populacija crne slavonske svinje grupirana u dva razreda od kojih su prvi razred činile svinje za koje je prethodno utvrđen genetski status, tj. njihova homozigotnost prema *MC1R* genu, i drugi razred u koji su bile uključene svinje crne slavonske pasmine križanke s nekom od komercijalnih pasmina svinja. Pri

vrijednosti K=2 jasno se vidi razdvajanje populacije pasmine crne slavonske svinje od ostalih pasmina (durok, landras, topigs, PIC, veliki jorkšir, pietrain). U ovom stupnju analize još nije došlo do razdvajanja križanaca crne slavonske svinje od životinja koje su homozigoti po *MC1R* genu. Pri povećanju broj genetskih klastera K, jasno se vidi razdvajanje i ostalih pasmina svinja (K=4 – K=8). Uz vrijednost K=8 što ujedno predstavlja i pretpostavljeni broj populacija svinja uključenih u istraživanje, pasmine su se jasno odvojile u svoje grupe. U skupini križanaca crne slavonske pasmine vidi se utjecaj ostalih pasmina koje su sudjelovale u postupcima križanja. Isti se rezultati mogu vidjeli iz prikaza genetske analize populacije vizualizirane Clumpak programskim paketom. Prikazom analize genetske strukture istraživanih populacija s obzirom na jedinke unutar svake populacije dobiva se jasan uvid međusobne povezanosti i interakcije crnih slavonskih svinja za koje je utvrđeno da su homozigoti po *MC1R* genu te svinja koje su križanci.



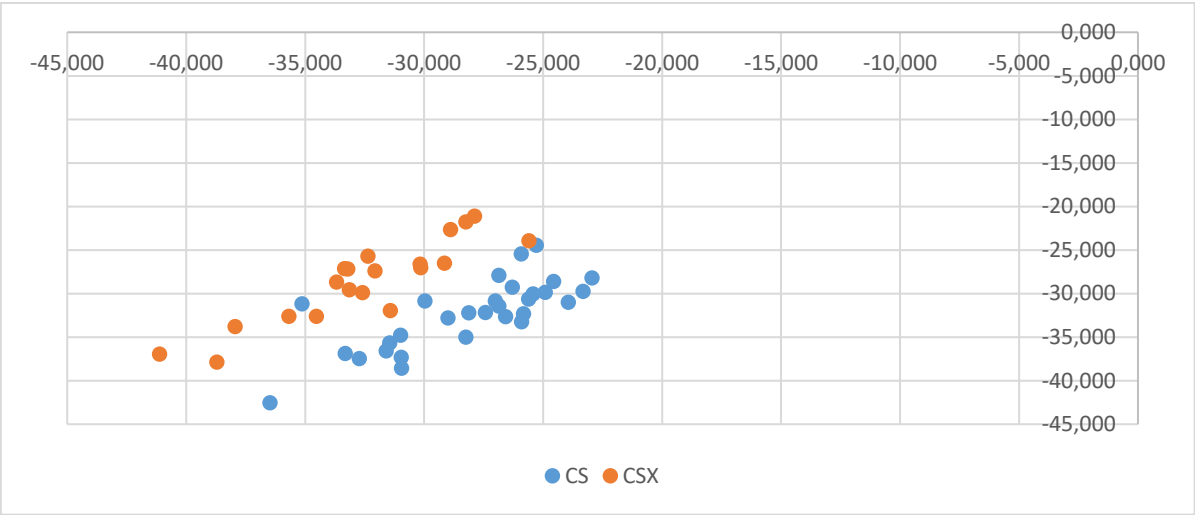
Slika 23. Rezultati STRUCTURE analiza vizualizirani Clumpak programskim paketom uz K=2-9 (1- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; 2- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; 3- durok; 4- veliki jorkšir; 5- landras; 6- PIC; 7- pietren; 8- topigs)

Vizualizacija rezultata dobivenih STRUCTURE programom je odrađena Clumpak programskim paketom (Kopelman i sur., 2015.). Rezultati obrade podataka Clumpak programom potvrđuju rezultate genetske analize u STRUCTURE programu. Nadalje, prilikom pretpostavke postojanja 9 populacija, uočljivo je rasipanje unutar populacije crne slavonske svinje na podskupine koje su sudjelovale u nastanku, što ukazuje da je 8 pretpostavljenih genetskih klastera stvarni broj klastera (Slika 23). Analiza strukture populacija je odrađena i programom GenAlEx. Strukturalna analiza populacija je potvrdila rezultate dobivene STRUCTURE softverom te je odvojila sve analizirane pasmine svinja u posebne razrede što je jasno vidljivo iz Grafa 2. Nadalje, analizom crne slavonske pasmine istim programskim paketom jasno je vidljivo odvajanje u dva genetska klastera (Graf 3.).



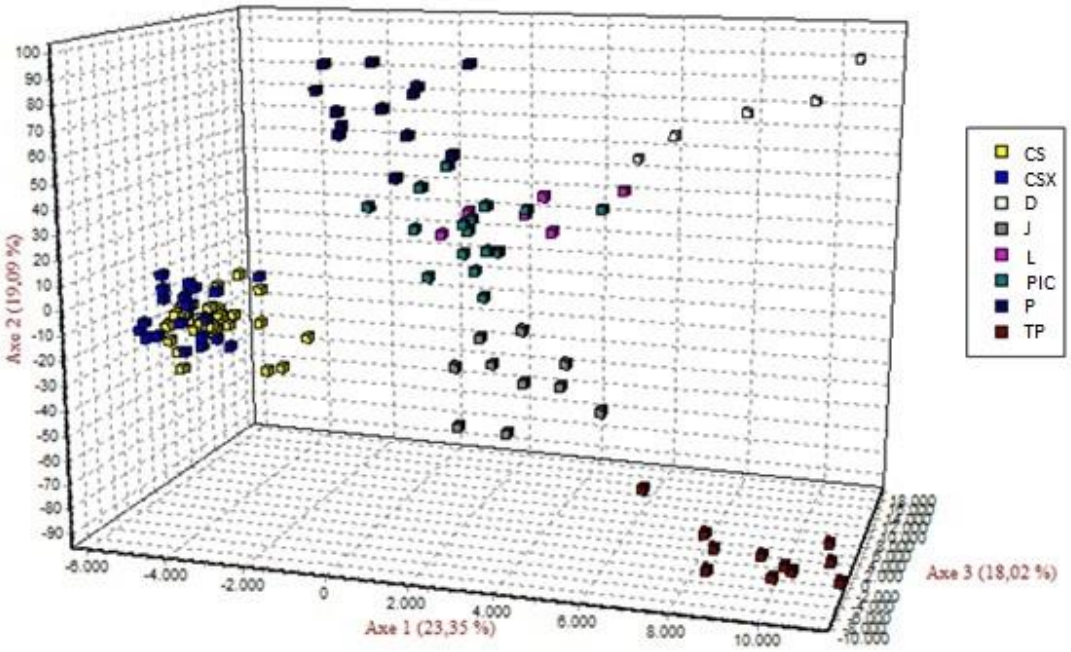
Graf 2. Klaster analiza populacija svinja uz set od 26 mikrosatelitska markera programkim paketom GenAlEx

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs)



Graf 3. Klaster analiza populacije crne slavonske pasmine svinja uz set od 26 mikrosatelitska markera programskim paketom GenAlEx

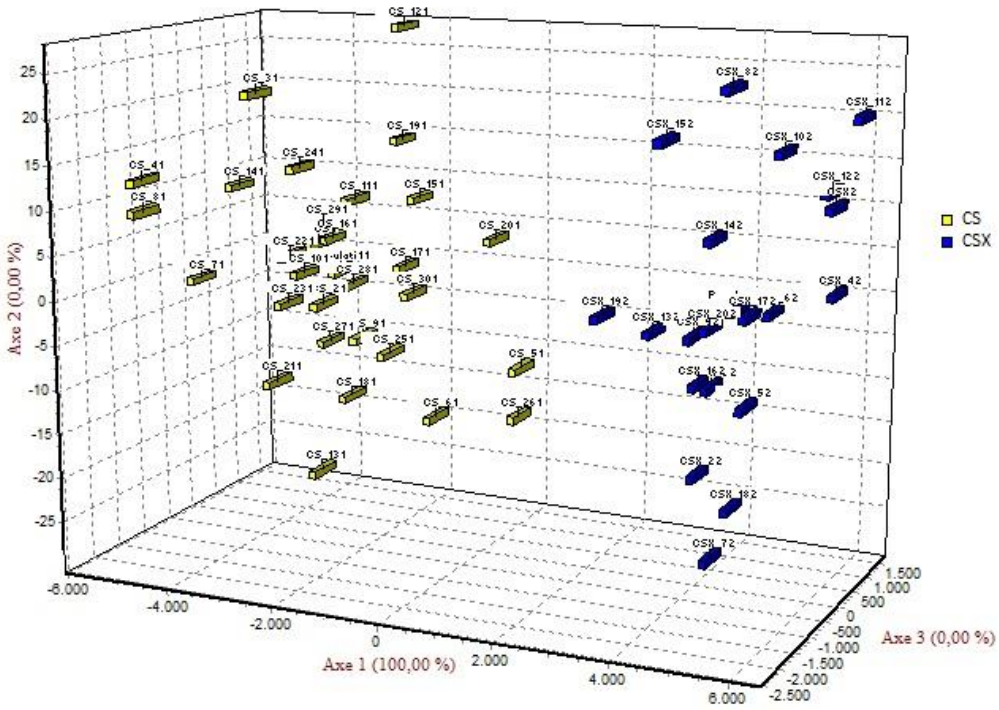
(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu)



Graf 4. Faktorijalna analiza korespondencije za ispitivane pasmine svinja uz set od 26 mikrosatelitska lokusa

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs)

Rezultate faktorijalne analize korespondencije (FCA) su ukazali 23,35 % ukupne varijabilnosti na prvoj osi, 19,09 % ukupne varijabilnosti na drugoj osi te 18,02 % ukupne varijabilnosti na trećoj osi. Odnosno, razdvajanje crnih svinja koje su heterozigoti po *MC1R* genu te križanaca od ostalih pasmina svinja (Graf 4.).



Graf 5. Faktorijalna analiza korespondencije za dvije skupine crne slavonske pasmine svinja (CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu)

Graf 5. prikazuje faktorijalnu analizu korespondencije koja jasno prikazuje razdvajanje pripadnika crne slavonske svinje koji su heterozigoti po *MC1R* genu od križanca crne slavonske svinje s nekim drugim pasminama. Uz programe koji se temelje na Bayesianovoj statistici u istraživanju je napravljena i faktorijalna analiza korespondencije (FCA) u programskom paketu Genetix. Faktorijalna analiza korespondencije daje veliki broj podataka o genetskim odnosima unutar i između populacija. Vizualizacija je predstavljena u n-dimenzialnom prostoru. Analizirani genotipovi su predstavljeni u 3D koordinatnom sustavu gdje su tri faktora opisala 100 % utvrđene genetske varijabilnosti.

Rezultati koji su dobiveni ovim načinom analize potvrdili su rezultate dobivene STRUCTURE analizom, tj. postojanje 8 populacija svinja. Uspoređujući metode analize i identifikacije svinja pomoću združene PCR metode te PCR-RFLP metode zaključuje se da je metoda identifikacije životinja sa setom mikrosatelita u združenim PCR reakcijama jednako učinkovita kao i ranije opisana PCR-RFLP metoda. Nadalje, smanjivanjem broja mikrosatelita na najmanji mogući broj, tj. njihovim optimiziranjem, značajno će se skratiti vrijeme provođenja analize te troškovi izvođenja. Krajnji cilj optimizacije mikrosatelita bilo bi stvaranje seta mikrosatelita specifičnih za crnu slavonsku svinju koji bi imao i svoju komercijalnu primjenu.

4.4. Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže

Tablica 13. Zbirni polimorfizmi za ispitivane pasmine svinja

PASMINA	N	H_{exp}±SD	$H_{n.b.}$±SD	H_{obs}±SD	$P_{(0,95)}$	$P_{(0,99)}$
Crna slavonska (CS)	30	0,6585 (0,1606)	0,6696 (0,1633)	0,6538 (0,1843)	1,0000	1,0000
Crna slavonska (CSX)	20	0,6421 (0,1640)	0,6585 (0,1682)	0,6231 (0,1872)	1,0000	1,0000
Durok	5	0,4315 (0,2525)	0,4795 (0,2805)	0,5154 (0,3158)	0,8077	0,8077
Veliki jorkšir	10	0,6262 (0,1075)	0,6626 (0,1140)	0,5821 (0,2532)	1,0000	1,0000
Landras	5	0,5669 (0,1788)	0,6299 (0,1987)	0,6308 (0,2753)	0,9615	0,9615
PIC	15	0,6652 (0,1310)	0,6882 (0,1355)	0,6538 (0,2048)	1,0000	1,0000
Pietrain	12	0,5685 (0,2035)	0,5932 (0,2124)	0,5449 (0,2519)	0,9615	1,0000
Topigs	10	0,4977 (0,1934)	0,5241 (0,2037)	0,5846 (0,2935)	0,9615	0,9615

*N= broj jedinki; H_{exp}= očekivana heterozigotnost; $H_{obs=}$ uočena heterozigotnost; SD= standardna devijacija

U tablici 13. su prikazane vrijednosti očekivane heterozigotnosti (H_{exp}), uočene hetreozigotnosti (H_{obs}), standardnih devijacija (SD) te p vrijednosti testiranja Hardy-Weinbergove ravnoteže za pasmine crne slavonske svinje koje su homozigoti po *MC1R* genu (CS) te heterozigoti (CSX), durok (D), veliki jorkšir (J), landras (L), PIC (PIC), pietrain (P) i topigs (TP). Očekivana heterozigotnost bila je u rasponu od 0,4315 kod durok pasmine do 0,6652 do PIC svinja. Uočena heterozigotnost je bila u rasponu od 0,5154 do 0,6538 kod crne slavonske svinje (CS) te duroka.

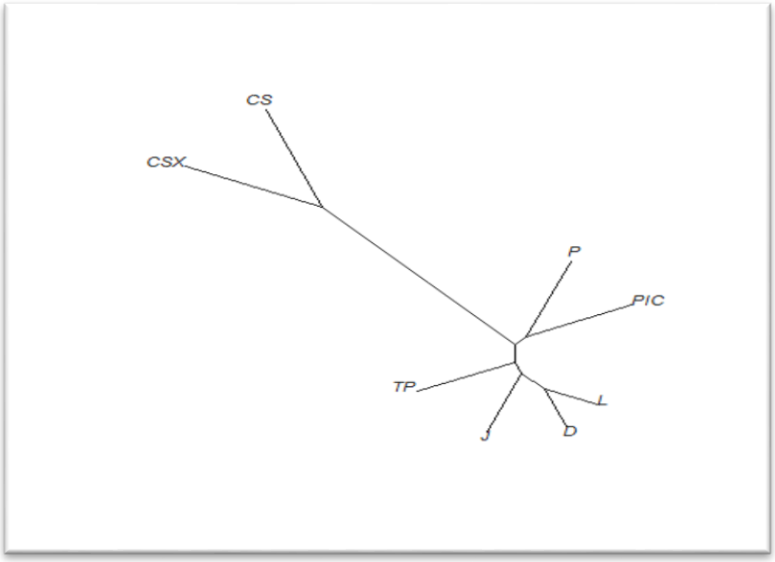
Istraživanja genetske varijabilnosti svinja u mnogim istraživanjima su temeljena na korištenju mikrosatelita kao molekularnih markera. Mikrosatelitski markeri su se pokazali kao pouzdani markerski sustav u analizi genetske diferencijacije istraživanih pasmina (Vincente i sur., 2008.). Mikrosatelitski markeri korišteni u našem istraživanju pokazali su visoki stupanj genetskog polimorfizma unutar populacije crne slavonske svinje, ali i između ispitivanih populacija s obzirom na prosječan broj alela po lokusu i dobivene vrijednosti heterozigotnosti. Genetska diferencijacija crne slavonske svinje pomoću mikrosatelitskih markera pokazala se kao pouzdanom metodom identifikacije pasmine (Margeta, 2013.). Istraživanjem su uspoređivani genotipovi 7 pasmina svinja (crna slavonska pasmina, durok, veliki jorkšir, landras, PIC, pietrain i topigs). Crna slavonska pasmina je bila diferencirana u dvije skupine s obzirom na to pripadaju li životinje skupini homozigota za *MC1R* gen ili su križanci s nekom drugom pasminom svinja. Početnom analizom je odabran set od 27 mikrosatelitska markera, no za sljedeću fazu analize jedan mikrosatelitski marker je isključen. U analizi je korišten set od 26 mikrosatelitskih markera grupiranih u združene PCR reakcije. Ispitana je učinkovitost seta mikrosatelitskih markera za autentifikaciju crne slavonske svinja.

Tablica 14. Genetska udaljenost izračunata prema Nei (1987.)

	CS	CSX	D	J	L	PIC	P	TP
CS		0,063	0,568	0,275	0,382	0,261	0,392	0,584
CSX	0,063		0,622	0,349	0,481	0,269	0,384	0,617
D	0,568	0,622		0,558	0,434	0,357	0,661	0,608
J	0,275	0,349	0,558		0,269	0,264	0,495	0,324
L	0,382	0,481	0,434	0,269		0,396	0,377	0,540
PIC	0,261	0,269	0,357	0,264	0,396		0,311	0,450
P	0,392	0,384	0,661	0,495	0,377	0,311		0,634
TP	0,584	0,617	0,608	0,324	0,540	0,450	0,634	

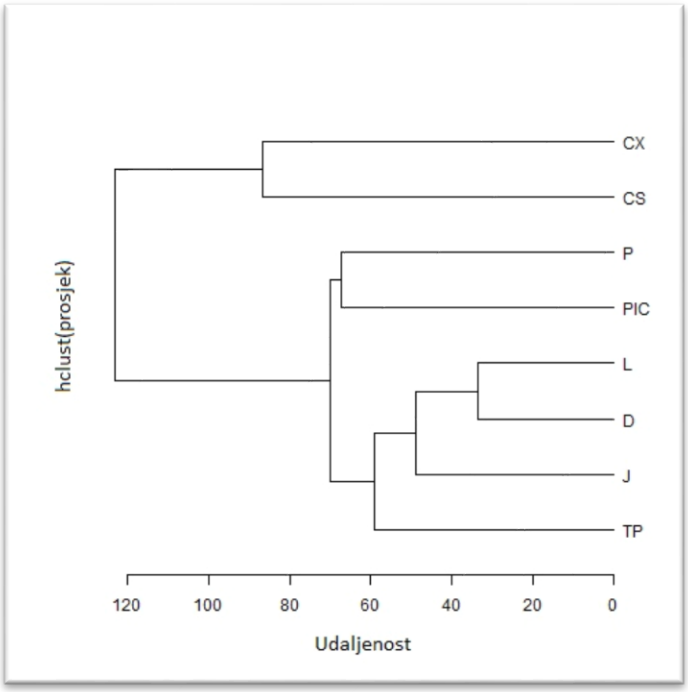
CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs

Tablicom 14. je prikazana genetska udaljenost izračunata prema Nei (1978.) za 8 populacija svinja i 26 mikrosatelitskih lokusa. Rezultati pokazuju najnižu genetsku udaljenost između pripadnika crne slavonske pasmine koji su homozigoti prema *MC1R* genu za boju te heterozigota, a koja iznosi 0,063 dok je najviša bila sa topigs svinjama te je iznosila 0,584. Heterozigoti su imali najvišu genetsku udaljenost s durok pasminom, a iznosila je 0,622. Genetska udaljenost durok pasmine je bila najniža s PIC svinjama (0,357), a najviša s pietrainom (0,661). Genetska udaljenost između velikog jorkšira i PIC svinja bila je 0,264 dok je najviša vrijednost bila 0,558 s durok svinjama. Najniža genetska udaljenost među landrasa i velikog jorkšira iznosila je 0,269, dok je najviša vrijednost bila 0,540 te je uočena s topigs svinjama. PIC svinje su imale najnižu vrijednost genetske udaljenosti s crnim slavonskim svinjama koje su homozigoti prema *MC1R* genu (0,261) dok je najviša vrijednost bila s topigsom, a iznosila je 0,450. Pietrain je imao najnižu genetsku udaljenost s PIC svinjama, a čija je vrijednost bila 0,311, dok je najviša vrijednost od 0,661 uočena s durok pasminom. Najniža genetska udaljenost u vrijednosti od 0,324 je uočena između topigs svinja i velikog jorkšira, dok je topigs imao najvišu vrijednost genetske udaljenosti s pietrainom te je iznosila 0,634. Slika 24. prikazuje neukorijenjeno filogenetsko stablo konstruirano NJ metodom u kojem je jasno vidljivo razdvajanje populacije crne slavonske svinje u dvije skupine te odvajanje od ostalih pasmina svinja koje su korištene u istraživanju. Slika 25. prikazuje UPGMA dijagram konstruiran analizom 8 pasmina svinja.



Slika 24. Neukorijenjeno filogenetsko stablo konstruirano NJ metodom

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs



Slika 25. UPGMA dijagram konstruiran analizom 8 pasmina svinja

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs

Tablica 15. Fiksacijski indeksi za 26 mikrosatelitna lokusa

MS	F_{is}	F_{it}	F_{st}	H_{exp}	H_{obs}	PIC
S0026	0,08618	0,13959	0,05844	0,7994	0,8318	0,7649
S0155	-0,01873	0,19777	0,21253	0,9051	0,9813	0,8930
S0005	-0,01068	0,10012	0,10963	0,7898	1,0000	0,7733
SW2410	0,00837	0,08853	0,08084	0,7931	1,0000	0,7589
SW632	0,03359	0,11655	0,08585	0,6135	0,6075	0,5839
SWr1941	0,03027	0,32304	0,30191	0,8442	0,9065	0,8224
SW24	-0,11777	0,05503	0,15459	0,8632	0,9720	0,8442
SW830	0,05286	0,20677	0,1775	0,8696	0,9346	0,8505
S0355	-0,03406	0,14891	0,17695	0,8520	0,9720	0,8309
SW936	0,01522	0,13204	0,11863	0,7231	0,9813	0,6857
S0218	0,55778	0,60742	0,11225	0,6001	0,6262	0,5295
S0228	-0,07221	0,26163	0,31136	0,8045	0,9533	0,7751
SW240	0,17200	0,23861	0,08044	0,8567	0,9388	0,8357
IGF1	0,17399	0,22881	0,06637	0,8038	1,0000	0,7838
SW2406	-0,05911	0,11043	0,16008	0,8201	0,8692	0,7921
SW122	0,08993	0,24848	0,17421	0,8546	0,9252	0,8350
SW857	-0,03117	0,11359	0,14038	0,8379	0,9533	0,8133
S0097	-0,02897	0,02687	0,05427	0,7709	0,9346	0,7441
SW72	0,04212	0,18969	0,15406	0,7595	0,7850	0,7228
S0226	0,05493	0,18941	0,23162	0,8353	0,9720	0,8101
SO090	0,19119	0,30981	0,14667	0,8441	0,9907	0,8218
SW911	-0,19450	0,00557	0,16749	0,8542	0,9907	0,8329
S0002	0,20072	0,25717	0,07062	0,7402	0,9907	0,7063
SW2008	-0,04313	0,10258	0,13969	0,7990	0,8879	0,7673
SW1067	0,07065	0,26095	0,20476	0,6593	0,7570	0,6593
S0101	-0,02523	0,05694	0,08015	0,7690	0,7650	0,7250
Ukupno	1,144	4,716	3,771	20,6622	23,5266	19,9618
Prosječno	0,044	0,181	0,145	0,7947	0,9048	0,7677

*F_{is}= koeficijent inbridinga; F_{it}= odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u istraživanim populacijama; F_st= odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže između populacija; H_{exp}= očekivana heterozigotnost; H_{obs}= uočena heterozigotnost; PIC= informacijski sadržaj polimorfizma

Tablica 15. prikazuje vrijednosti fiksacijskih indeksa F_{is}, F_{it} i F_{st} za 26 analiziranih mikrosatelitskih lokusa zbirno za sve ispitivane pasmine svinja. Vrijednosti su određene uz interval povjerenja od 95 % te 1000 bootstraps po lokusu. Prosječna vrijednost koeficijenta inbrdinga (F_{is}) za 26 analizirana mikrosatelitska markera iznosila je 0,044, dok su odstupanja od Hardy Weinbergove ravnoteže unutar i između ispitivanih populacija (F_{it}, F_{st}) iznosile 0,181 te 0,145. Uočavaju se razlike u F_{st} vrijednostima što ukazuje na visoki stupanj genetske diferencijacije između ispitivanih pasmina. Prosječna vrijednost očekivane heterozigotnosti za analizirane mikrosatelitne markere iznosila je 0,9048, dok je prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti iznosila 0,7847. Srednja vrijednost informacijskog sadržaja polimorfizma (PIC) iznosila je 0,7677. Najniža vrijednost je zabilježena na lokusu SO218 dok je najvišu vrijednost imao SO155 lokus. Informacijski sadržaj polimorfizma je parametar koji određuje stupanj informativnosti određenog markera. PIC vrijednosti mogu biti u rasponu od 0 do 1. Prema Bolsteinu i sur. (1980.) markeri imaju visoki stupanj informativnosti ukoliko je PIC > 0,5, srednji stupanj informativnosti ako je PIC >0,25 te niski stupanj informativnosti ukoliko je PIC <0,25. Prema dobivenim rezultatima PIC vrijednosti može se zaključiti da svih 26 mikrosatelitnih markera koji su korišteni u istraživanju imaju visoki stupanj informacijskog sadržaja polimorfizma. Najniža PIC vrijednost je utvrđena za marker SO218, a iznosila je 0,5295 dok je najviša vrijednost utvrđena za marker SO155 te je iznosila je 0,8930. Saho i sur. (2016.) su temeljem mikrosatelitske analize indijskih autohtonih pasmina utvrdili PIC vrijednosti 0,41 do 0,81 što je niže nego u našem istraživanju.

Ukupni gubitak heterozigotnosti između osam istraživanih pasmina svinja uz set od 26 mikrosatelitska markera procijenjen je mjerom odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže unutar populacija (F_{it}). Prosječne F_{it} i F_{st} vrijednosti iznosile su 0,181 i 0,145. Najviša F_{it} vrijednost zabilježena je na lokusu SO218 te je iznosila 0,60742, dok je najniža bila na lokusu SW911, a njezina vrijednost je bila 0,00557. Najviša F_{st} vrijednost zabilježena je za lokus SO228 te je iznosila 0,31136, dok je najniža vrijednost od 0,06637 zabilježena za lokus IGF1. Prosječna vrijednost svih 26 mikrosatelitnih markera iznosila je 0,145 što ukazuje na to da se 14,5 % ukupne genetske varijabilnosti može objasniti razlikama između populacijama, dok je 85,5 % genetske varijabilnosti posljedica razlika između jedinki unutar populacije te između populacija. Koeficijent inbridinga (F_{is}) označava stupanj križanja u bliskom srodstvu mjereći gubitak heterozigotnosti unutar populacije. Najniža vrijednost koeficijenta inbridinga zabilježena je na lokusu S0005 te je iznosila -0,01068, dok je najviša vrijednost bila 0,55778, a utvrđena je za lokus SO218. Prosječna F_{is} vrijednost za svih 26 istraživanih mikrosatelita

iznosila je 0,044. Visoke vrijednost koeficijenta inbridinga posljedica su visokog stupnja inbridinga dok negativne vrijednosti ukazuju na nedostatak heterozigota. Visoki stupanj inbridinga može biti posljedica nedostatka selekcijskih postupaka te malog broja životinja od kojih je započela revitalizacija pasmine tijekom 1990. godine. Odstupanja od Hardy Weinbergove ravnoteže posljedica su nedostatka heterozigotnosti.

Tablica 16. Frekvencije alela za 26 analiziranih lokusa po istraživanim populacijama svinja

Lokus	Alel	CS	CSX	D	J	L	PIC	P	TP	Ukupno
S0026	1	0	0	0	0	0	0,0667	0	0	0,0667
	2	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	3	0,5333	0,45	0,3	0,35	0,4	0,4	0,5	0,4	3,3333
	4	0,1333	0,075	0	0,1	0,4	0,1	0,0833	0	0,8916
	5	0,1	0,225	0,4	0,05	0	0,3667	0,3333	0	1,475
	6	0,2167	0,25	0,1	0,5	0,2	0,0667	0,0833	0,6	2,0167
	7	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0,2
S0155	1	0	0	0	0,05	0	0	0	0	0,05
	2	0,3833	0,3	0	0,25	0,2	0,1333	0,1667	0,15	1,5833
	3	0	0	1	0	0	0,0667	0	0	1,0667
	4	0,0667	0	0	0	0,1	0,0333	0,125	0	0,325
	5	0,3	0,05	0	0,35	0	0,1333	0	0,8	1,6333
	6	0,1	0,175	0	0,3	0,1	0,5	0,125	0,05	1,35
	7	0,15	0,25	0	0,05	0	0,1333	0,5833	0	1,1666
	8	0	**0,225**	0	0	0	0	0	0	0,225
S0005	1	0,0667	0	0	0,25	0	0,0333	0,0833	0,1	0,5333
	2	0	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,025
	3	0,05	0,075	0	0	0	0	0,0417	0	0,1667
	4	0	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,025
	5	0	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,025
	6	0	0	0	0	0,5	0	0,1667	0	0,6667
	7	**0,0833**	**0**	0	0	0	0	0	0	0,0833
	8	**0**	**0,175**	0	0	0	0	0	0	0,175
	9	0,0333	0	0	0	0	0,0333	0	0	0,0666
	10	0	0	0	0	0	0,0333	0	0	0,0333
	11	**0,0833**	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,1083
	12	0,05	0,1	0	0,05	0,1	0,0667	0,0417	0	0,4084
	13	0,0333	0	0	0,05	0	0,1333	0,125	0,1	0,4416
	14	0,1167	0,15	0	0	0	0	0,125	0,65	1,0417
	15	0,0333	0	0	0	0	0,0667	0,25	0	0,35
	16	0,2167	0,05	0	0	0,1	0,2333	0,0417	0	0,6417
	17	0	0,225	0	0	0	0,0333	0	0	0,2583
	18	0,1833	0	0	0,4	0,3	0,0667	0,0417	0,15	1,1417
	19	0,05	0,075	0,1	0,15	0	0,0667	0,0833	0	0,525
	20	0	0,05	0,4	0	0	0,0333	0	0	0,4833
	21	0	0	0	0	0	0,1333	0	0	0,1333
	22	0	0	0	0	0	0,0333	0	0	0,0333
	23	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0,2
	24	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0,3
	25	0	0	0	0	0	0,0333	0	0	0,0333
Sw24	1	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0,2
	2	0	0	0	0	0	0	0,0417	0	0,0417
	3	0,7333	0,775	0,6	0,7	0,6	0,5333	0,7083	0,6	5,2499
	4	**0,1667**	**0,125**	0	0	0	0	0	0	0,2917
	5	0	0	0	0	0	0	0,2083	0	0,2083

	6	0,0833	0,05	0,4	0	0,4	0,0667	0,0417	0	1,0417
	7	0	0	0	0,25	0	0,1667	0	0,4	0,8167
	8	0,0167	0,05	0	0,05	0	0,0333	0	0	0,15
Sw632	1	0,2833	0,225	0	0,1	0,3	0,3	0,25	0,1	1,5583
	2	0,5667	0,675	1	0,7	0,2	0,6	0,2083	0,65	4,6
	3	0	0,025	0	0,1	0,1	0	0,1667	0	0,3917
	4	0	0	0	0,05	0	0,0333	0	0	0,0833
	5	**0,05**	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,075
	6	0	0	0	0	0	0,0667	0,3333	0	0,4
	7	0,1	0	0	0,05	0	0	0,0417	0,1	0,2917
	8	0	**0,05**	0	0	0	0	0	0	0,05
Swr1941	1	0	0	0,8	0,35	0,8	0	0	0,5	2,45
	2	0,7333	0,85	0,2	0,05	0	0,7333	0,4583	0,2	3,2249
	3	0,0167	0	0	0,05	0,1	0	0	0,25	0,4167
	4	0,2167	0,075	0	0,05	0	0,0667	0,2083	0,05	0,6667
	5	0,0333	0	0	0,1	0	0	0	0	0,1333
	6	0	0	0	0	0	0	0,0417	0	0,0417
	7	0	0,075	0	0	0	0	0,0417	0	0,1167
	8	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0,1
	9	0	0	0	0,05	0	0	0	0	0,05
	10	0	0	0	0,35	0,1	0	0	0	0,45
	11	0	0	0	0	0	0,1	0,25	0	0,35
Sw2410	1	0	0	0	0	0	0,0333	0	0	0,0333
	2	0	0,25	0	0	0,3	0,1	0	0	0,65
	3	0,0167	0,05	0	0	0,1	0,0667	0,125	0	0,3584
	4	0,2	0,125	0,1	0	0	0	0	0	0,425
	5	0,0167	0	0	0	0	0	0,1667	0	0,1834
	6	0,2167	0,25	0,5	0,1	0,3	0,1667	0,25	0	1,7834
	7	0,0167	0,075	0	0	0	0,0333	0	0	0,125
	8	0	0	0	0	0	0,0667	0	0	0,0667
	9	0,4667	0,375	0,1	0,45	0	0,1667	0	0,1	1,6584
	10	0,0333	0,025	0	0,1	0,3	0,2333	0,4583	0	1,1499
	11	0,0333	0,05	0,2	0,35	0	0	0	0,7	1,3333
	12	0	0,025	0,1	0	0	0,1333	0	0,2	0,4583
Sw830	1	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	2	0,0333	0,05	0	0	0	0	0	0,5	0,5833
	3	0,55	0,475	0	0,45	0,2	0,1	0	0	1,775
	4	0	0,5	0,2	0,05	0,1	0	0	0	0,85
	5	0,55	0	0	0,2	0,2	0,0667	0,3	0	1,3167
	6	0,55	0	0,8	0,15	0	0,4333	0,25	0,45	2,6333
	7	0,55	0,175	0	0	0,5	0,2667	0	0,05	1,5417
	8	0	0	0	0,15	0	0	0,0833	0	0,2333
	9	**0,1833**	**0,2**	0	0	0	0	0	0	0,3833
	10	0,0667	0,05	0	0	0	0,1333	0,2917	0	0,5417
S0355	1	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	2	0	0	0	0	0	0,0667	0,125	0	0,1917
	3	0	0	0	0,05	0	0,0333	0	0,15	0,2333
	4	0,3333	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2083	0	0,9416
	5	0	**0,15**	0	0	0	0	0	0	0,15
	6	0,1667	0	0	0,25	0,3	0	0	0,1	0,8167
	7	0,1333	0,175	0	0,05	0	0,0667	0,1667	0,1	0,6917
	8	0,3333	0,05	0,4	0,55	0,5	0,333	0,0417	0,65	2,858
	9	0	0,575	0	0	0	0,3	0,4583	0	1,3333
	10	0,0167	0	0	0	0,1	0	0	0	0,1167
	11	0	0,05	0	0	0	0,1	0	0	0,15
Sw936	1	0,1333	0,1	0	0,05	0	0,0333	0	0,15	0,4666
	2	0,05	0,125	0	0,25	0,5	0,0333	0,1667	0	1,125
	3	0	0	0	0	0	0	0,125	0	0,125
	4	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	5	0,2167	0,125	0	0	0	0,1333	0,0417	0,1	0,6167

	6	0,0333	0	0	0	0	0	0	0,35	0,3833
	7	0,5	0,575	0,8	0,15	0,2	0,3	0,25	0,15	2,925
	8	0	0,025	0,2	0,55	0,3	0,3	0,25	0,25	1,875
	9	0,05	0,05	0	0	0	0,2	0,1667	0	0,4667
S0218	1	0	0	0	0,05	0	0	0	0	0,05
	2	0,5167	0,7	0,7	0,8	1	0,8333	0,6667	1	6,2167
	3	0,4833	0,3	0	0,15	0	0,1667	0,3333	0	1,4333
	4	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0,3
S0228	1	0,0167	0	0	0,05	0	0,3667	0,333	0	0,7664
	2	0,0167	0,05	0	0	0	0	0	0,45	0,5167
	3	0,8833	0,8	0,4	0,2	0,6	0,3667	0,3333	0	3,5833
	4	0,0333	0	0	0,2	0	0,2	0,0417	0	0,475
	5	0,0167	0,05	0,6	0,05	0,4	0,0667	0	0	1,1834
	6	0,0333	0,075	0	0,15	0	0	0	0	0,2583
	7	0	0,025	0	0,35	0	0	0,2917	0,55	1,2167
sw240	1	0	0,05	0	0,05	0	0,2	0	0,1	0,4
	2	0,0833	0,25	0,1	0	0,2	0	0,2083	0,05	0,8916
	3	0,0333	0	0,3	0,15	0	0	0,0417	0	0,525
	4	0,0333	0,325	0,3	0,5	0,2	0,6	0,375	0,85	3,1833
	5	0	0	0	0	0	0,0333	0	0	0,0333
	6	**0,0167**	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,0417
	7	0,1833	0,125	0	0	0	0	0,0417	0	0,35
	8	0,1667	0,275	0,3	0	0	0	0,25	0	0,9917
	9	0,0667	0,15	0	0	0,2	0	0,0833	0	0,5
	10	0	0	0	0,3	0,3	0,0667	0	0	0,6667
	11	**0,0833**	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,1083
	12	**0,0333**	0	0	0	0	0	0	0	0,0333
	13	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0,1
IGF1	1	0	0	0	0,166	0	0	0	0	0,1667
	2	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0,5
	3	0,0333	0,025	0	0	0	0	0	0,0625	0,1208
	4	0,0167	0,025	0	0	0	0	0,0417	0	0,0834
	5	0,2	0,175	0	0	0,1	0,0667	0,0833	0	0,625
	6	0,0667	0,125	0,8	0	0,5	0,333	0,375	0,0625	2,2622
	7	0,1833	0,2	0	0	0,1	0,1667	0,0417	0	0,6917
	8	0,15	0,175	0,1	0,333	0,1	0,2333	0,25	0,25	1,5913
	9	0,1	0,175	0	0	0,1	0,0667	0,2083	0,0625	0,7125
	10	0,0667	0	0,1	0	0	0,0667	0	0	0,2334
	11	0,0833	0	0	0	0,1	0	0	0	0,1833
	12	0,1	0,1	0	0	0	0,0667	0	0	0,2667
Sw2406	1	0,05	0,025	0	0	0,1	0	0	0	0,175
	2	0,5333	0,4	0,4	0,65	0,6	0,6333	0,9583	0,35	4,5249
	3	0,1833	0,375	0	0	0	0,0667	0	0	0,625
	4	0	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0,2
	5	0,2	0,125	0,2	0,1	0	0	0	0	0,625
	6	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0,1
	7	0	0	0	0,25	0	0,3	0	0,65	1,2
	8	0	0	0	0	0	0	0,0417	0	0,0417
	9	0	0,05	0	0	0	0	0	0	0,05
	10	0	0	0,3	0	0,1	0	0	0	0,4
	11	**0,0167**	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,0417
	12	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
Sw122	1	0,2	0,1	0	0,15	0,3	0,0333	0,2083	0	0,9916
	2	0,0667	0,1	0,2	0	0,2	0	0	0,2	0,7667
	3	0,2667	0,1	0,5	0,35	0,1	0,3	0	0,75	2,3667
	4	**0,1333**	**0,125**	0	0	0	0	0	0	0,2583
	5	0	0	0	0	0	0,1333	0	0	0,1333
	6	0,0167	0	0	0,05	0	0	0	0	0,0667
	7	0,1	0,25	0	0,3	0	0,3667	0	0,05	1,0667
	8	0	0	0	0,3	0,1	0,4	0,1667	0,7917	1,7584

	9	0,1667	0,3	0,05	0	0	0	0	0	0,5167
	10	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	11	**0,0333**	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,0583
Sw857	1	0,0667	0	0	0,15	0,3	0,2667	0	0	0,7834
	2	0,1667	0,075	0	0	0	0	0,2917	0	0,5334
	3	0	0	0	0	0,1	0,0333	0	0	0,1333
	4	0,5333	0,25	0,1	0,45	0,3	0,3667	0,4167	0	2,4167
	5	0,2	0,5	0,5	0,05	0,3	0,2333	0,1667	0,1	2,05
	6	0,1	0,05	0	0,05	0	0	0,0833	0,25	0,5333
	7	0,0833	0,125	0	0	0	0,1	0	0	0,3083
	8	0	0	0,2	0,3	0	0	0,0417	0,65	1,1917
S0097	1	0,2167	0,15	0,4	0,2	0,3	0,5333	0,5417	0,15	2,4917
	2	0,0833	0,1	0	0,1	0,2	0,1	0	0	0,5833
	3	**0,0167**	**0,25**	0	0	0	0	0	0	0,2667
	4	0,0167	0,175	0	0	0	0	0,125	0,25	0,5667
	5	0,0167	0	0,2	0	0	0	0	0	0,2167
	6	0,3	0,25	0,4	0,45	0,3	0,2667	0,25	0	2,2167
	7	0,0333	0,075	0	0	0	0	0	0	0,1083
	8	0,0667	0,025	0	0,05	0	0,0667	0,0833	0,25	0,5417
	9	0,15	0,2	0	0,2	0,2	0,0333	0	0,1	0,8833
	10	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25
Sw72	1	0,4833	0,375	0,6	0,05	0,3	0,5	0,9167	0,85	4,075
	2	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0,1
	3	0,2333	0,45	0	0,4	0	0,1	0,0833	0,1	1,3666
	4	0,2667	0,15	0,2	0,45	0,6	0,2	0	0,05	1,9167
	5	0,0167	0,025	0,2	0	0	0,1667	0	0	0,4084
	6	0	0	0	0	0,1	0,0333	0	0	0,1333
S0226	1	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	2	0,0667	0,025	1	0,05	0,5	0,2	0	0	1,8417
	3	0,25	0,3	0	0,45	0,5	0,3	0,8333	0	2,6333
	4	0,0167	0,075	0	0	0	0	0	0	0,0917
	5	0,0167	0,3	0	0,4	0	0,2667	0,125	0,95	2,0584
	6	0	0	0	0,05	0	0	0	0,05	0,1
	7	0	0	0	0,05	0	0,2333	0,0417	0	0,325
	8	0,1	0,075	0	0	0	0	0	0	0,175
	9	**0,0167**	**0,175**	0	0	0	0	0	0	0,1917
	10	**0,0667**	**0,05**	0	0	0	0	0	0	0,1167
SO090	1	0	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,025
	2	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	3	**0,0333**	0	0	0	0	0	0	0	0,0333
	4	**0,0167**	**0,05**	0	0	0	0	0	0	0,0667
	5	**0,0333**	0	0	0	0	0	0	0	0,0333
	6	0,2	0,125	1	0,25	0	0,6667	0,125	0,4	2,7667
	7	0,0167	0	0	0	0,2	0	0	0	0,2167
	8	0,2333	0,275	0	0,5	0,4	0,2333	0,0417	0,15	1,8333
	9	0,3833	0,45	0	0,1	0,4	0,0667	0,5417	0,1	2,0417
	10	0	0,025	0	0,1	0	0,0333	0,25	0,3	0,7083
	11	0	0	0	0,05	0	0	0	0,05	0,1
	12	0	0,05	0	0	0	0	0,0417	0	0,0917
	13	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
Sw911	1	0	0	0	0	0	0,0667	0	0	0,0667
	2	0,0667	0,05	0,6	0,4	0,8	0,2	0,7083	0,6	3,425
	3	0,35	0,2	0,4	0,15	0,2	0,2333	0,2083	0,2	1,9416
	4	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0,1
	5	0,2667	0,275	0	0	0	0,1333	0	0	0,675
	6	0,3	0,425	0	0,3	0	0,0333	0,0833	0,2	1,3416
	7	0,0167	0,05	0	0,05	0	0,3333	0	0	0,45
S0002	1	0,0167	0	0,1	0,1	0	0	0,4583	0	0,675
	2	0,15	0,175	0	0,05	0	0,0667	0	0,05	0,4917
	3	0	0	0	0	0	0,0333	0	0	0,0333

	4	0,3333	0,425	0,5	0,45	0	0,5333	0,4167	0,2	2,8583
	5	**0,15**	**0,05**	0	0	0	0	0	0	0,2
	6	0	**0,05**	0	0	0	0	0	0	0,05
	7	0,1	0,05	0,2	0	0	0	0	0	0,35
	8	0	0	0	0	0	0	0	0,05	0,05
	9	0,1833	0,2	0,1	0,3	0,6	0,2	0	0,35	1,9333
	10	0,05	0,05	0	0,1	0,4	0,1667	0,125	0,35	1,2417
	11	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0,1
	12	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
Sw2008	1	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	2	0	0	0	0	0	0,0333	0	0	0,0333
	3	0,7167	0,75	0,5	0,535	0,8	0,2667	0,8333	0,7	5,1017
	4	0,2667	0,2	0,5	0,5	0,35	0,4333	0	0	2,25
	5	0	0,05	0	0,15	0	0,2667	0,1667	0,3	0,9334
Sw1067	1	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0,4
	2	0	0	0	0	0	0,0333	0	0	0,0333
	3	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0,5
	4	0,0167	0,05	0	0,4	0,3	0,0167	0,0167	0,15	0,9501
	5	0,0333	0,025	0	0	0	0	0	0	0,0583
	6	0,2	0,175	0,2	0	0,2	0,4667	0	0,05	1,2917
	7	0,0167	0,05	0	0	0	0	0,0833	0	0,15
	8	0,55	0,6	0	0,5	0	0,1	0	0,35	2,1
	9	0,0667	0,025	0,8	0,5	0	0,1	0,0417	0,15	1,6834
	10	0	0,05	0	0,1	0	0,0333	0,0417	0,3	0,525
	11	0	0	0	0	0	0	0,0167	0	0,0167
	12	0,0167	0,025	0	0	0,1	0	0	0	0,1417
S0101	1	0	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,025
	2	**0,0333**	0	0	0	0	0	0	0	0,0333
	3	0	0	0	0	0	0	0	0,05	0,05
	4	0	0	0	0,05	0	0,0333	0	0,05	0,1333
	5	**0,05**	**0,05**	0	0	0	0	0	0	0,1
	6	0	**0,025**	0	0	0	0	0	0	0,025
	7	0,05	0	0	0	0	0,2667	0	0	0,3167
	8	0,5667	0,45	1	0,7	0,7	0,4333	0,4176	0,2	4,4676
	9	0,3	0,375	0	0,25	0,3	0,2	0,5833	0,45	2,4583
	10	0	0,075	0	0	0	0,0667	0	0,25	0,3917

CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs

Tablicom 16. je prikazana frekvencija alela za 26 mikrosatelitna markera prema ispitivanim pasminama svinja. Identificirano je 16 privatnih alela koji su specifični samo za svinje crne slavonske pasmine koje su homozigoti prema *MC1R* genu (CS). Kod heterozigota prema *MC1R* genu crne slavonske svinje (CSX) identificirano je 10 privatnih alela koji se javljaju samo kod ove skupine svinja. Analizom je utvrđeno postojanje 17 alela koji se javljaju kod križanaca i homozigota prema *MC1R* genu, no kod ostalih ispitivani pasmina njihova prisutnost nije zabilježena.

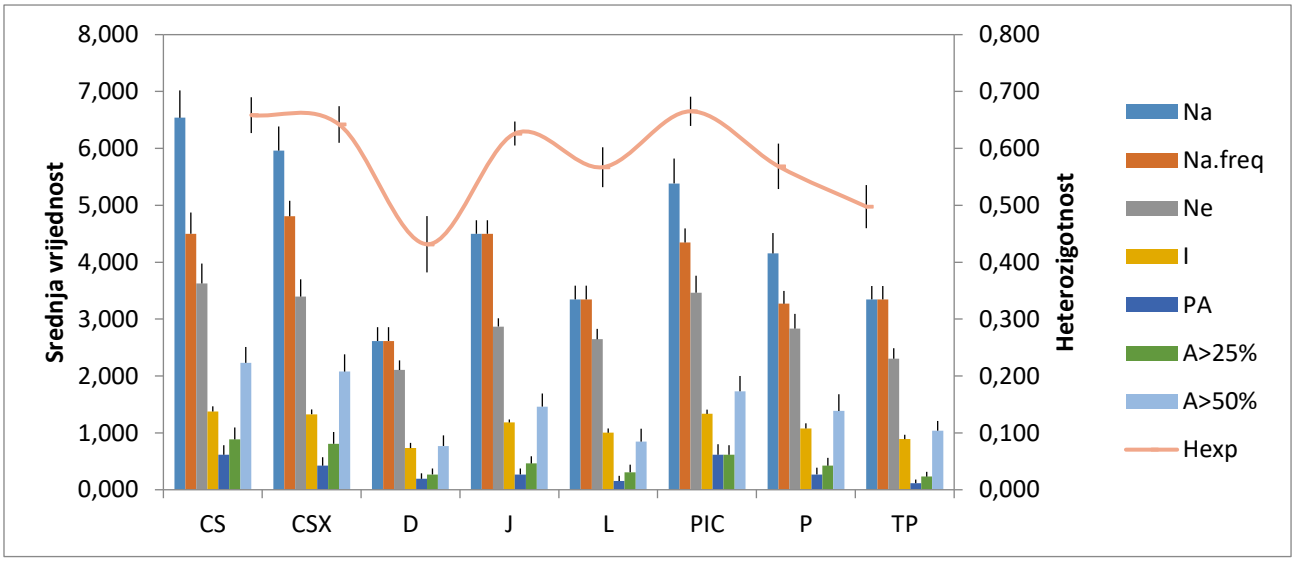
Tablica 17. Privatni aleli i njihove frekvencije kod crne slavonske pasmine svinja

Lokus	Alel	CS	CSX	D	J	L	PIC	P	TP	Ukupno
S0026	2	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
S0005	2	0	0,025	0	0	0	0	0	0	0,025
	4	0	0,025	0	0	0	0	0	0	0,025
	5	0	0,025	0	0	0	0	0	0	0,025
	7	**0,0833**	0	0	0	0	0	0	0	0,0833
	8	0	0,175	0	0	0	0	0	0	0,175
	11	0,0833	0,025	0	0	0	0	0	0	0,1083
Sw830	1	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	9	0,1833	0,2	0	0	0	0	0	0	0,3833
S0355	1	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	5	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0,15
Sw936	4	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
sw240	6	0,0167	0,025	0	0	0	0	0	0	0,0417
	11	0,0833	0,025	0	0	0	0	0	0	0,1083
	12	**0,0333**	0	0	0	0	0	0	0	0,0333
Sw2406	11	0,0167	0,025	0	0	0	0	0	0	0,0417
	12	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
Sw122	4	0,1333	0,125	0	0	0	0	0	0	0,2583
	10	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	11	0,0333	0,025	0	0	0	0	0	0	0,0583
S0226	1	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	9	0,0167	0,175	0	0	0	0	0	0	0,1917
	10	0,0667	0,05	0	0	0	0	0	0	0,1167
SO090	1	0	0,025	0	0	0	0	0	0	0,025
	2	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	3	**0,0333**	0	0	0	0	0	0	0	0,0333
	4	0,0167	0,05	0	0	0	0	0	0	0,0667
	5	**0,0333**	0	0	0	0	0	0	0	0,0333
	13	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
S0002	5	0,15	0,05	0	0	0	0	0	0	0,2
	6	0	0,05	0	0	0	0	0	0	0,05
	12	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
Sw2008	1	**0,0167**	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
S0101	1	0	0,025	0	0	0	0	0	0	0,025
	2	**0,0333**	0	0	0	0	0	0	0	0,0333
	5	0,05	0,05	0	0	0	0	0	0	0,1
	6	0	0,025	0	0	0	0	0	0	0,025

CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs

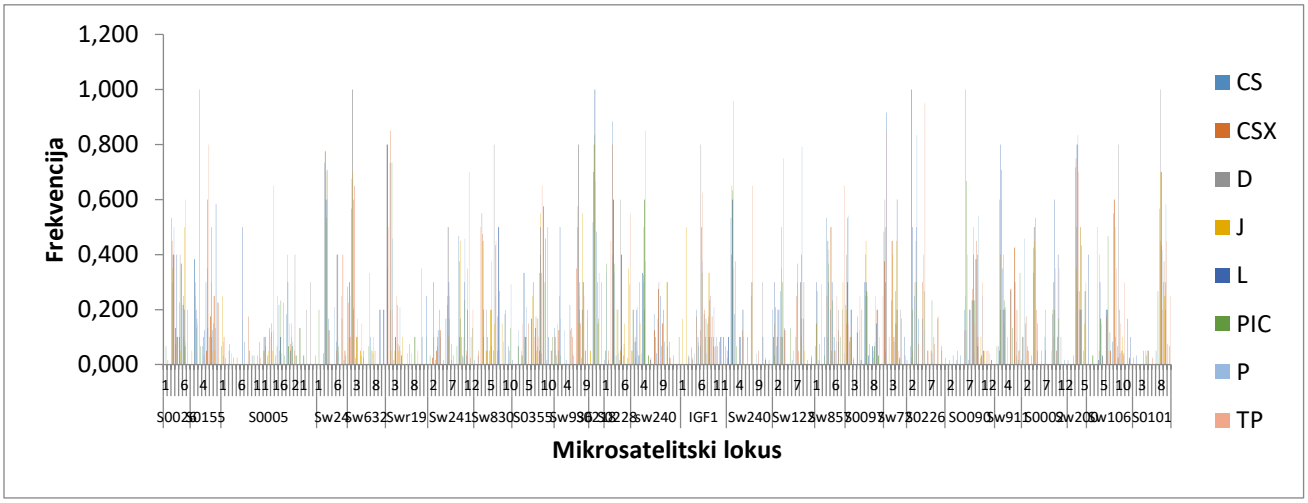
Tablicom 17. su prikazani privatni aleli zabilježeni kod svinje crne slavonske pasmine homozigota prema *MC1R* genu. Frekvencije privatnih alela su se kretale od 8,3 % kod lokusa SO005 do 1,67 % kod čak 11 lokusa (S0026, Sw830, S0355, Sw936, Sw24006, Sw122,

S0226, SO090, S0002, Sw2008). Frekvencija od 3,33 % zabilježena je kod lokusa sw240, SO090 i S0101. Ukupna zastupljenosti otkrivenih privatnih alela iznosila je 40,02 % na 13 mikrosatelitskih markera. Najveću frekvenciju privatnih alela imao je lokus SO090. Isti marker je ujedno imao i najveći broj privatnih alela, njih 4.



Graf 6. Sumarna analiza alela za 8 istraživanih populacija svinja

(Na= broj različitih alela; Na_{freq}=frekvencija alela; Ne= efektivni broj alela; I= Shannonov informacijski indeks; PA= broj privatnih alela u populaciji; A>25%= broj alela pronađenih u 25% populacije; ; A>50%= broj alela pronađenih u 50% populacije; Hexp= očekivana heterozigotnost)



Graf 7. Frekvencije istraživanih alela u populacijama svinja

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs)

Najveći broj alela je zabilježen kod crne slavonske pasmine svinja te je iznosio 6,538, dok je najniži broj od 2,615 utvrđen kod durok pasmine. Sukladno tome su bile i njihove frekvencije u populacijama te su se kretale od 2,615 do 4,500. Nadalje, kod crne slavonske pasmine svinja koje su homozigoti po *MC1R* genu je zabilježen i najveći efektivni broj alela koji je iznosio 3,626 kao i najviša vrijednost Shannonovog indexa od 1,375. Broj privatnih alela se kretao od 0,115 kod topigs svinja do 0,615 kod PIC svinja te crne slavonske svinje (Graf 6., Graf 7.).

Tablica 18. Broj alela po lokusima i istraživanim pasminama svinja

MS	**CS**	**CSX**	**D**	**J**	**L**	**PIC**	**P**	**TP**
S0026	5	4	4	4	3	5	4	2
S0155	5	5	1	5	4	6	4	3
S0005	12	12	4	7	4	14	10	4
Sw24	4	4	2	3	2	5	4	2
Sw632	4	5	1	5	5	4	5	4
Swr19	4	3	2	7	3	4	5	4
Sw241	8	9	5	4	4	9	4	3
Sw830	8	6	2	5	4	5	4	3
S0355	6	5	3	5	4	7	5	4
Sw936	7	6	2	4	3	6	6	5
S0218	2	2	2	3	1	2	2	1
S0228	6	5	2	6	2	4	4	2
Sw240	9	8	4	4	5	5	6	3
IGF1	10	8	3	3	6	7	6	4
Sw24006	6	6	4	3	5	3	2	2
Sw122	9	7	3	6	4	5	2	3
Sw857	6	5	4	5	4	5	5	3
S0097	9	8	3	5	4	5	4	5
Sw72	4	4	3	4	3	5	2	3
S0226	8	7	1	5	2	4	3	2
SO090	10	7	1	5	3	4	5	5
Sw911	5	5	2	5	2	6	3	3
S0002	8	7	5	5	2	5	3	5
Sw200	3	3	2	3	2	4	2	2
Sw106	7	8	2	3	4	6	6	5
S0101	5	6	1	3	2	5	2	5
Ukupno	170	155	68	117	87	140	108	87
Prosječno	6,5	6,0	2,6	4,5	3,3	5,4	4,2	3,3

CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs

Ukoliko se mikrosateliti koriste u genetskim istraživanjima, broj alela po lokusu ne bi trebao biti manji od 4 (Barker, 1994.) dok imati prosječne vrijednosti heterozigotnost u populaciji moraju biti u granicama od 0,3 i 0,8. Genetski markeri koji se koriste za genetske analize pasmina moraju imati dovoljno genetske raznolikosti. Utvrđeno je postojanje 16 alela specifičnih za crnu slavonsku pasminu koji su homozigoti po *MC1R* genu te 10 alela javilo isključivo kod križanaca. Nadalje, utvrđena je pojavnost 17 alela kod obje skupine crne slavonske pasmine svinja. Na markerima Sw106, Sw911, Sw72, Sw857, IGF1, SO228, SO218, Sw241 i Sw1914 nisu pronađeni aleli koji su prisutni isključivo kod pripadnika dvije skupine crne slavonske svinje, a da ujedno nisu prisutni i kod drugih pasmina svinja. Po jedan alel specifičan za crnu slavonsku svinju identificiran je na Sw200, SO097, Sw936, Sw24, SO155 i SO026 lokusima. Iako se na lokusu SO005 nalazi 25 alela, na njemu nije identificiran najveći broj privatnih alela specifičnih samo za svinje crne slavonske pasmine. Na ovom je lokusu identificirano 6 alela od kojih su alel 2,4 i 5 specifični samo za križance, dok se aleli 7,8 i 11 javljaju kod svinja obje skupine. Lokus Sw632 je imao dva alela specifična za svinje crne slavonske pasmine od kojih je jedan bio prisutan samo kod križanaca. Dva alela su identificirana na lokusu Sw830 od kojih je jedan bio identificiran kod obje skupine svinja dok je drugi bio specifičan samo za svinje koje su heterozigoti po *MC1R* genu. Na lokusu SO355 identificirana su dva alela, od kojih se jedan javio samo kod svinja koje su heterozigoti po *MC1R* genu, dok je jedan alel bio specifičan samo za križance. Tri su alela identificirana na lokusu Sw240, od kojih su aleli 6 i 11 zajednički za dvije skupine svinja, dok se alel 12 javlja samo kod svinja koje su heterozigoti po *MC1R* genu. Na lokusu Sw24006, alel 11 identificiran je kod obje skupine crnih slavonskih svinja, dok je alel 12 identificiran samo kod svinja koje su heterozigoti prema *MC1R* genu. Na Sw122 lokusu su pronađena tri alela specifična za pripadnike crne slavonske svinje. Aleli 4 i 11 su zajednički za dvije skupine, dok se alel 10 pojavio samo kod pripadnika koji su heterozigoti po *MC1R* genu. Na lokusu SO090 identificirano je 6 alela. Jedan alel je identificiran kod obje skupine svinja, jedan samo kod križanaca, dok je čak njih 4 prisutno je samo kod heterozigota po *MC1R* genu. Ukupno tri alela od kojih su dva specifična za heterozigote po *MC1R* genu, a dva za heterozigote su pronađena na SOOO2 lokusu. Alel 4 se javio kod obje skupine crnih svinja, dok se alel 6 javlja samo kod križanca, a alel 12 kod heterozigota. Na lokusu S0101 otkriveno je četiri alela koja su prisutna samo kod pripadnika crne slavonske svinje, od kojih je dva prisutno samo kod heterozigota po *MC1R* genu, dva su specifična samo za križance, dok je jedan zajednički za obje skupine. Provedena su istraživanja kojima je pokazan različit broj alela u pasminama svinja. Prosječan broj alela za kineske pasmine svinja kretao se od 4,31 do 6,10 (Fan i sur., 2003.) dok je kod europskih pasmina taj broj od 3,22 do 5,84 (Laval i sur., 2000.). Kim i sur. (2005.) navode da je prosječan broj alela po lokusu za durok pasminu 4,31

dok je za landras prosječan broj alela iznosio 5,69. Luetkemeier i sur. (2010.) su u svom istraživanju dobili prosječnu vrijednosti broja alela po lokusu 2,74 za durok pasminu dok je vrijednosti prosječnog broja alela kod velikog jorkšira iznosila 2,44. Prosječan broj alela po lokusu kod landras pasmine je iznosila 3,09. Daleko najviši broj alela po lokusu su naveli Michailidou i sur. (2012.). Prosječan broj alela po lokusu u istraživanju koje su proveli na crnoj grčoj pasmini svinja kretao se oko 12,27 alela (10-16 alela). Gama i sur. (2013.) su zabilježili prosječan broj alela po lokusu kod Iberijske svinje od 3,63. Ayizanga i sur. (2016.) su izračunali prosječan broj alela po lokusu za velikog jorkšira 4,58, dok je za gansku pasminu to bilo 10,58. Revidatti i sur. (2014.) su zabilježili prosječan broj alela po lokusu 6,25 dok je u istraživanju Pardo i sur. (2014.) prosječan broj alela za Tierralta pasminu bio 6,9. Razlike u prosječnom i ukupnom broju alela po ispitivanim populacijama mogu biti posljedica manje ili veće polimorfnosti mikrosatelita koji su korišteni u genetskoj analizi.

Najveći ukupni broj alela zabilježen je kod crne slavonske pasmine svinja, njih 170, dok je najmanje ukupno alela utvrđeno kod durok pasmine, tek njih 68. (Tablica 18.). Prosječan broj alela za 26 analiziranih mikrosatelitskih markera iznosila je 6,538. Brojnost alela po pojedinim markerima se znatno razlikuje te se kreće od 2 alela kod S0218 do 12 alela kod S0005. Statistička značajnost je utvrđena markere: S0218(P<0,001), S0002(P<0,01), Sw240(P<0,05) i S0002(P<0,05). U Tablici 19. je prikazan broj alela (N), očekivana (H_{exp}) i uočena heterozigotnosti (H_{obs}), koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F_{is}) te statistička značajnost F_{is} vrijednosti (F_{is}sign) za pripadnike crne slavonske pasmine koje su homozigoti prema *MC1R* genu. Broj alela (N), očekivana (H_{exp}) i uočena heterozigotnosti (H_{obs}), koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F_{is}) te statistička značajnost F_{is} vrijednosti (F_{is}sign) za heterozigote po *MC1R* genu crne slavonske pasmine prikazani su u Tablici 20. Ukupan broj alela bio je 155. Prosječan broj alela iznosio je 5,961. Najmanji broj alela, njih dva, zabilježen je kod S0218 markera, dok je 12 alela što je ujedno i najviši broj zabilježen kod markera S0005. Prosječne vrijednosti očekivane i zabilježene heterozigotnosti su iznosile 0,6420 te 0,6230. Statistička značajnost je uočena na markerima Sw1067(P<0,001), IGF1(P<0,01), Sw106(P<0,01) te na S0002(P<0,05).

Tablica 19. Zbirni polimorfizmi za crnu slavonsku pasminu (CS)

MS	N	H_{exp}	$H_{n,b}$	H_{obs}	F_{is}	F_{is}sign
S0026	5	0,6406	0,6514	0,5667	0,132	0,2083
S0155	5	0,7261	0,7384	0,6667	0,099	0,5499
S0005	12	0,8767	0,8915	0,8667	0,028	0,0816
SW24	4	0,4272	0,4345	0,4333	0,003	0,2520
SW632	4	0,5861	0,5960	0,7000	-0,178	0,5180
SWr19	4	0,4139	0,4209	0,4333	-0,030	0,4426
SW241	8	0,6922	0,7040	0,7333	-0,042	0,0543
SW830	8	0,6506	0,6616	0,6000	0,095	0,1290
S0355	6	0,7317	0,7441	0,7333	0,015	0,5521
SW936	7	0,6789	0,6904	0,7333	-0,063	0,9202
S0218	2	0,4994	0,5079	0,1667	0,676	0,0003***
S0228	6	0,2167	0,2203	0,2333	-0,060	1,0000
SW240	9	0,8067	0,8203	0,6667	0,190	0,0116*
IGF1	10	0,8667	0,8814	0,8667	0,017	0,1513
SW24006	6	0,6389	0,6497	0,7333	-0,131	0,4215
SW122	9	0,8272	0,8412	0,8000	0,050	0,2002
SW857	6	0,6539	0,6650	0,6667	-0,003	0,9320
S0097	9	0,8139	0,8277	0,9333	-0,130	0,6456
SW72	4	0,6406	0,6514	0,6000	0,080	0,4297
S0226	8	0,8350	0,8492	0,9000	-0,061	0,2725
SO090	10	0,7528	0,7655	0,7000	0,087	0,0100*
SW911	5	0,7117	0,7237	0,7667	-0,060	0,6049
S0002	8	0,7972	0,8107	0,7000	0,139	0,0060**
SW200	3	0,4150	0,4220	0,5000	-0,189	0,5582
SW106	7	0,6378	0,6486	0,7000	-0,081	0,0877
S0101	5	0,5828	0,5927	0,6000	-0,013	0,0978
UKUPNO	170	17,120	17,410	17	0,57	9,109
Prosječno	6,538	0,6584	0,6696	0,6538	0,0219	0,351

*N= broj alela; $H_{exp=}$ očekivana heterozigotnost; H_{obs}= uočena heterozigotnost-; F_{is}= koeficijent križanja u bliskom srodstvu; F_{is}sign = značajna razlika F_{is} vrijednosti
P<0,001***, P<0,01**; P<0,05***

Tablica 20. Zbirni polimorfizmi za crnu slavonsku pasminu (CSX)

MS	N	H_{exp}	$H_{n,b}$	H_{obs}	F_{is}	F_{is}sign
S0026	4	0,6788	0,6962	0,6500	0,068	0,6016
S0155	5	0,7638	0,7833	0,8000	-0,022	0,4014
S0005	12	0,8675	0,8897	0,8500	0,046	0,7582
SW24	4	0,3788	0,3885	0,4000	-0,031	0,2905
SW632	5	0,4900	0,5026	0,5000	0,005	0,6091
SWr19	3	0,2662	0,2731	0,3000	-0,101	1,0000
SW241	9	0,7688	0,7885	0,8500	-0,080	0,2458
SW830	6	0,6963	0,7141	0,7000	0,020	0,8737
S0355	5	0,6113	0,6269	0,7000	-0,120	0,2965
SW936	6	0,6250	0,6410	0,6000	0,066	0,5644
S0218	2	0,4200	0,4308	0,3000	0,309	0,2798
S0228	5	0,3487	0,3487	0,4000	-0,122	1,0000
SW240	8	0,7762	0,7962	0,7000	0,124	0,3914
IGF1	8	0,8413	0,8413	0,5500	0,369	0,0019**
SW24006	6	0,6800	0,6974	0,6500	0,070	0,9352
SW122	7	0,8012	0,8218	0,9000	-0,098	0,7273
SW857	5	0,6637	0,6808	0,7000	-0,029	0,3598
S0097	8	0,8275	0,8487	0,8500	-0,002	0,4072
SW72	4	0,6337	0,6500	0,5500	0,157	0,4420
S0226	7	0,7750	0,7949	0,8500	-0,071	0,7731
SO090	7	0,7000	0,7179	0,5500	0,239	0,1633
SW911	5	0,6987	0,7167	0,8500	-0,192	0,0074**
S0002	7	0,7388	0,7577	0,5500	0,279	0,0281*
SW200	3	0,3950	0,4051	0,4500	-0,114	0,4927
SW106	8	0,6000	0,6154	0,3000	0,519	0,0002***
S0101	6	0,6475	0,6641	0,7000	-0,056	0,2091
UKUPNO	155	16,693	17,091	16,2	1,233	11,822
Prosječno	5,961	0,6420	0,6573	0,6230	0,0474	0,537

*N= broj alela; $H_{exp=}$ očekivana heterozigotnost; H_{obs}= uočena heterozigotnost-; F_{is}= koeficijent križanja u bliskom srodstvu; F_{is}sign = značajna razlika F_{is} vrijednosti
P<0,001***, P<0,01**; P<0,05***

Istraživanja genetske strukture populacije crne slavonske svinje pomoću mikrosatelita kao molekularnih markera proveli su Bradić i sur. (2007.), Druml i sur. (2012.), Đikić i sur. (2012.) i Margeta (2012.). Bradić i sur. (2007.) su proveli istraživanje koje je uključivalo 42 svinje sa šest različitih lokacija. Genotipizacija je napravljena uz set od 8 mikrosatelitska markera. Prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti iznosila je 0,357±0,026. Prosječna vrijednost koeficijenta inbridinga za sve promatrane markere iznosila je 0,216. Nadalje broj alela je bio 2,50±0,76 što je znatno manje nego vrijednost dobivena u našem istraživanju. Druml i sur. (2012.) su proveli istraživanje na 40 životinja crne slavonske pasmine uz set od 19 mikrosatelitskih markera. Nadalje, istraživanje je bilo uključeno i sedam drugih pasmina svinja karakterističnih za područje jugo-istočne Europe. Očekivana heterozigotnost iznosila je 0,64 dok je vrijednost uočene heterozigotnosti bila 0,59 što je manje nego vrijednost dobivena našim istraživanjem. Prosječan broj alela bio je niži nego broj izmjeren u našem istraživanju, a iznosio je 5,37. Vrijednost koeficijenta inbridinga iznosila je 0,01 te nije uočena statistička značajnost F_{is} vrijednosti. Đikić i sur. (2012.) su pomoću seta od 14 mikrosatelitska markera istražili genetsku strukturu crne slavonske svinje i turopoljske svinje. Rezultati istraživanja su ukazali na prosječan broj alela od 6,4 te prosječne vrijednost očekivane heterozigotnosti od 0,72. Margeta (2012.) je istražio genetsku strukturu crne slavonske pasmine uz set od 18 mikrosatelitska markera. Vrijednosti očekivane heterozigotnosti bile su 0,62 dok je vrijednost uočene heterozigotnosti iznosila 0,57 što je niže nego vrijednosti dobivene u našem istraživanju. Prosječan broj alela po lokusu iznosio je 5,61. Nadalje, rezultati analize gena za crnu boju dlake su ukazali na to da je 35 % analiziranih uzoraka bilo homozigotno po *MC1R* genu što ukazuje da nije došlo do križanja crnih svinja sa nekim drugim pasminama, već se radi o pripadnicima čiste pasmine. Šprem i sur. (2014.) su proveli istraživanje u kojem su analizirali 28 uzoraka crne slavonske svinje te 46 uzoraka turopoljske svinje. Genetska analiza je napravljena uz set od 14 mikrosatelitska markera. Ukupan broj alela iznosio je 156 uz 9 prosječnih broj alela po lokusu. Vrijednosti uočene heterozigotnosti bile su u rasponu od 0,158 do 0,912. Očekivana heterozigotnost iznosila je od 0,165 do 0,874.

Tablica 21. Zbirni polimorfizmi za durok pasminu (D)

MS	N	H_{exp}	$H_{n,b}$	H_{obs}	F_{is}	F_{is}sign
S0026	4	0,7000	0,7778	0,8000	-0,032	0,6981
S0155	1	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
S0005	4	0,7000	0,7778	1,0000	-0,333	1,0000
SW24	2	0,4800	0,5333	0,8000	-0,600	0,4292
SW632	1	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
SWr19	2	0,3200	0,3556	0,4000	-0,143	1,0000
SW241	5	0,6800	0,7556	0,8000	-0,067	0,4922
SW830	2	0,3200	0,3556	0,4000	-0,143	1,0000
S0355	3	0,5800	0,6444	0,4000	0,407	0,3644
SW936	2	0,3200	0,3556	0,4000	-0,143	1,0000
S0218	2	0,4200	0,4667	0,6000	-0,333	1,0000
S0228	2	0,4800	0,5333	0,8000	-0,600	0,4285
SW24006	4	0,7200	0,8000	0,6000	0,273	0,6552
IGF1	3	0,3400	0,3778	0,4000	-0,067	1,0000
SW240	4	0,7000	0,7778	1,0000	-0,333	1,0000
SW122	3	0,6200	0,6889	0,6000	0,143	0,1110
SW857	4	0,6600	0,7333	0,6000	0,200	0,3741
S0097	3	0,6400	0,7111	0,4000	0,467	0,1101
SW72	3	0,5600	0,6222	0,8000	-0,333	1,0000
S0226	1	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
SO090	1	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
SW911	2	0,4800	0,5333	0,8000	-0,600	0,4298
S0002	5	0,6800	0,7556	0,8000	-0,067	1,0000
SW200	2	0,5000	0,5556	0,6000	-0,091	1,0000
SW106	2	0,3200	0,3556	0,4000	-0,143	1,0000
S0101	1	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
UKUPNO	68	11,22	12,466	13,4	-2,538	15,092
Prosječno	2,615	0,4315	0,4795	0,5153	-0,1209	0,718

*N= broj alela; $H_{exp=}$ očekivana heterozigotnost; H_{obs}= uočena heterozigotnost-; F_{is}= koeficijent križanja u bliskom srodstvu; F_{is}sign = značajna razlika F_{is} vrijednosti
P<0,001***, P<0,01**; P<0,05***

Tablica 22. Zbirni polimorfizmi za jorkšir pasminu (J)

MS	N	H_{exp}	$H_{n,b}$	H_{obs}	Fis	F_{is}sign
S0026	4	0,6150	0,6474	0,6000	0,077	0,4282
S0155	5	0,7200	0,7579	0,9000	-0,200	0,8974
S0005	7	0,7450	0,7842	0,8000	-0,021	0,3481
SW24	3	0,4450	0,4684	0,4000	0,153	1,0000
SW632	5	0,4850	0,5105	0,6000	-0,187	1,0000
SWr19	7	0,7350	0,7737	0,6000	0,234	0,0768
SW241	4	0,6550	0,6895	0,6000	0,136	0,6342
SW830	5	0,7100	0,7474	0,8000	-0,075	0,8998
S0355	5	0,6200	0,6526	0,8000	-0,241	1,0000
SW936	4	0,6100	0,6421	0,5000	0,231	0,3268
S0218	3	0,3350	0,3526	0,1000	0,727	0,0095**
S0228	6	0,7700	0,8105	1,0000	-0,250	0,2104
SW24006	4	0,6350	0,6684	0,1000	0,857	0,0002***
IGF1	3	0,6111	0,7333	0,3333	0,600	0,2018
SW240	3	0,5050	0,5316	0,4000	0,258	0,3033
SW122	6	0,7500	0,7895	0,7000	0,119	0,5481
SW857	5	0,6800	0,7158	0,6000	0,169	0,6340
S0097	5	0,7050	0,7421	0,7000	0,060	0,2711
SW72	4	0,6250	0,6579	0,6000	0,092	1,0000
S0226	5	0,6300	0,6632	0,9000	-0,385	0,2836
SO090	5	0,6650	0,7000	0,1000	0,864	0,0001***
SW911	5	0,7150	0,7526	0,9000	-0,209	0.7646
S0002	5	0,6850	0,7211	0,5000	0,318	0,1045
SW200	3	0,6050	0,6368	0,4000	0,385	0,2054
SW106	3	0,5800	0,6105	0,8000	-0,333	0,1610
S0101	3	0,4450	0,4684	0,4000	0,153	1,0000
UKUPNO	117	16,281	17,228	15,133	3,532	11,534
Prosječno	4,5	0,6262	0,6626	0,5820	0,1358	0,524

*N= broj alela; $H_{exp=}$ očekivana heterozigotnost; H_{obs}= uočena heterozigotnost-; F_{is}= koeficijent križanja u bliskom srodstvu; F_{is}sign = značajna razlika F_{is} vrijednosti
P<0,001***, P<0,01**; P<0,05***

Tablica 23. Zbirni polimorfizmi za landras pasminu (L)

MS	N	H_{exp}	$H_{n,b}$	H_{obs}	F_{is}	F_{is}sign
S0026	3	0,6400	0,7111	0,8000	-0,143	0,4908
S0155	4	0,5800	0,6444	0,8000	-0,280	1,0000
S0005	4	0,6400	0,7111	1,0000	-0,481	0,4298
SW24	2	0,4800	0,5333	0,4000	0,273	1,0000
SW632	5	0,7800	0,8667	0,8000	0,086	0,7038
SWr19	3	0,3400	0,3778	0,4000	-0,067	1,0000
SW241	4	0,7200	0,8000	1,0000	-0,290	1,0000
SW830	4	0,6600	0,7333	0,8000	-0,103	0,7456
S0355	4	0,6400	0,7111	0,6000	0,172	0,3012
SW936	3	0,6200	0,6889	0,6000	0,143	0,1102
S0218	1	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
S0228	2	0,4800	0,5333	0,0000	1,000	0,0463*
SW240	5	0,7800	0,8667	1,0000	-0,176	1,0000
IGF1	6	0,7000	0,7778	0,8000	-0,032	0,8691
SW24006	5	0,6000	0,6667	0,8000	-0,032	1,0000
SW122	4	0,7000	0,7778	0,8000	-0,231	0,6935
SW857	4	0,7200	0,8000	0,6000	0,273	0,6621
S0097	4	0,7400	0,8222	1,0000	- 0,250	0,5383
SW72	3	0,5400	0,6000	0,8000	-0,391	1,0000
S0226	2	0,5000	0,5556	0,6000	-0,091	1,0000
SO090	3	0,6400	0,7111	0,4000	0,467	0,1134
SW911	2	0,3200	0,3556	0,4000	-0,143	1,0000
S0002	2	0,4800	0,5333	0,4000	0,273	1,0000
SW200	2	0,3200	0,3556	0,4000	-0,143	1,0000
SW106	4	0,7000	0,7778	0,6000	0,250	0,0484*
S0101	2	0,4200	0,4667	0,6000	-0,333	1,0000
UKUPNO	87	14,84	16,377	16,4	-0,249	17,657
Prosječno	3,3461	0,5669	0,6299	0,6307	-0,01	0,767

*N= broj alela; $H_{exp=}$ očekivana heterozigotnost; H_{obs}= uočena heterozigotnost-; F_{is}= koeficijent križanja u bliskom srodstvu; F_{is}sign = značajna razlika F_{is} vrijednosti
P<0,001***, P<0,01**; P<0,05***

Tablica 24. Zbirni polimorfizmi za PIC (PIC)

MS	N	H_{exp}	$H_{n,b}$	H_{obs}	F_{is}	F_{is}sign
S0026	5	0,6867	0,7103	0,8000	-0,131	0,5553
S0155	6	0,6911	0,7149	0,6667	-0,070	0,1040
S0005	14	0,8844	0,9149	0,8000	0,130	0,1779
SW24	5	0,6422	0,6644	0,4667	0,305	0,0047**
SW632	4	0,5444	0,5632	0,3333	0,417	0,0504*
SWr19	4	0,4378	0,4529	0,4000	0,120	0,1743
S241	9	0,8511	0,8805	1,0000	-0,141	0,2741
SW830	5	0,7089	0,7333	0,4000	0,463	0,0017**
S0355	7	0,7689	0,7954	0,8000	-0,006	0,4306
SW936	6	0,7600	0,7862	0,8000	-0,018	0,7167
S0218	2	0,2778	0,2874	0,2000	0,311	0,3256
S0228	4	0,6867	0,7103	0,8667	-0,230	0,1665
SW240	5	0,5844	0,6046	0,5333	0,122	0,2120
IGF1	7	0,7889	0,8161	0,7333	0,105	0,3774
SW24006	3	0,5044	0,5218	0,6000	-0,156	0,7841
SW122	5	0,7289	0,7540	0,6667	0,119	0,3381
SW857	3	0,7289	0,7540	1,0000	-0,342	0,0219*
S0097	5	0,6289	0,6506	0,6667	-0,026	0,7135
SW72	5	0,6711	0,6943	0,6667	0,041	0,8712
S0226	4	0,7444	0,7701	0,6667	0,138	0,6135
SO090	4	0,4956	0,5126	0,5333	-0,042	1,0000
SW911	6	0,7711	0,7977	1,0000	-0,265	0,0932
S0002	5	0,6422	0,6644	0,4667	0,305	0,1751
SW200	4	0,6689	0,6920	0,6000	0,137	0,8144
SW106	6	0,7022	0,7264	0,7333	-0,010	0,1332
S0101	5	0,6956	0,7195	0,6000	0,171	0,1209
UKUPNO	138	17,295	17,891	17,000	1,447	9,176
Prosječno	5,3076	0,6652	0,6881	0,6538	0,0556	0,416

*N= broj alela; $H_{exp=}$ očekivana heterozigotnost; H_{obs}= uočena heterozigotnost-; F_{is}= koeficijent križanja u bliskom srodstvu; F_{is}sign = značajna razlika F_{is} vrijednosti
P<0,001***, P<0,01**; P<0,05***

U Tablici 21. su prikazani rezultati broja alela (N), očekivane (H_{exp}) i uočene heterozigotnosti (H_{obs}), koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F_{is}) te statistička značajnost F_{is} vrijednosti (F_{is}sign) za svinje durok pasmine. Kod durok pasmine je utvrđen najmanji broj alela, njih 68. Prosječan broj alela iznosio je 2,651, očekivana heterozigotnost je bila 0,4315 dok je uočena heterozigotnost iznosila 0,5153. Najveći broj alela zabilježen je na lokusima Sw2410 i S0002 te je iznosilo 5, dok je najmanje alela, tek 1, zabilježen na lokusima S0155, Sw632, S0226, SO090 i S0101. Kod durok pasmine nije utvrđena statistička značajnost koeficijenta križanja.

Broj alela (N), očekivana (H_{exp}) i uočena heterozigotnosti (H_{obs}), koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F_{is}) te statistička značajnost F_{is} vrijednosti (F_{is}sign) za pasminu veliki jorkšir prikazani su u Tablici 22. Prosječan broj alela iznosio je 4,5 dok je ukupan broj alela iznosio 117. Zabilježeno je 7 lokusa (Sw24, S0218, IGF1, Sw240, Sw200, Sw106, S0101) s po 3 alela što je ujedno i najmanji zabilježeni broj alela po lokusu. Po 7 alela je zabilježeno na dva lokusa S0005 i Sw1941 što predstavlja najveći broj alela po lokusu. Prosječne vrijednosti očekivane i zabilježene heterozigotnosti su iznosile 0,6262 te 0,5820. Statistička značajnost je uočena na lokusima sw240(P<0,001), SO090(P<0,001) i S0218(P<0,01).

U Tablici 23. su prikazani rezultati broja alela (N), očekivana (H_{exp}) i uočena heterozigotnosti (H_{obs}), koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F_{is}) te statistička značajnost F_{is} vrijednosti (F_{is}sign) za svinje landras pasmine. Utvrđen je ukupan broj alela koji je iznosio 87. Prosječan broj alela iznosio je 3,3461, očekivana heterozigotnost je bila 0,5669 dok je uočena heterozigotnost iznosila 0,6307. Najveći broj alela zabilježen je na lokusu IGF1 te je iznosilo 7, dok je najmanje alela, tek 1, zabilježen na lokusu S0218. Na lokusima Sw106 (P<0,05) i S0228 (P<0,05) je uočena statistička značajnost koeficijenta inbridinga.

U Tablici 24. su prikazani rezultati broja alela (N), očekivana (H_{exp}) i uočena heterozigotnosti (H_{obs}), koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F_{is}) te statistička značajnost F_{is} vrijednosti (F_{is}sign) za PIC svinje. Ukupan broj alela bio je 138. Prosječan broj alela iznosio je 5,3076, očekivana heterozigotnost je bila 0,6652 dok je uočena heterozigotnost iznosila 0,6538. Najveći broj alela zabilježen je na lokusu S0005 te je iznosilo 14, dok je najmanje alela, njih 2, zabilježeno na lokusu S0218.Statistička značajnost koeficijenta inbridiga je uočena na markerima Sw24(P<0,01), Sw830(P<0,01) i Sw632(P<0,05).

Tablica 25. Zbirni polimorfizmi za pietrain pasminu (P)

MS	N	H_{exp}	$H_{n,b}$	H_{obs}	F_{is}	F_{is}sign
S0026	4	0,6250	0,6522	0,5833	0,110	0,7691
S0155	4	0,6007	0,6268	0,7500	-0,207	0,9231
S0005	10	0,8576	0,8949	0,9167	-0,025	0,7792
SW24	4	0,4514	0,4710	0,4167	0,120	0,7043
SW632	5	0,7535	0,7862	0,6667	0,158	0,6013
SWr19	5	0,6806	0,7101	0,7500	-0,059	0,6203
SW241	4	0,6840	0,7138	1,0000	-0,427	0,1055
SW830	4	0,7049	0,7355	0,5833	0,214	0,2081
S0355	5	0,7014	0,7319	0,7500	-0,026	0,7320
SW936	6	0,8021	0,8370	0,6667	0,211	0,1272
S0218	2	0,4444	0,4638	0,0000	1,000	0,0008***
S0228	4	0,6910	0,7210	0,5000	0,316	0,0980
SW240	6	0,7431	0,7754	0,8333	-0,078	0,7813
IGF1	6	0,7431	0,7754	0,5000	0,365	0,1065
SW24006	2	0,0799	0,0833	0,0833	0,000	-
SW122	2	0,3299	0,3442	0,2500	0,283	0,4026
SW857	5	0,7049	0,7355	0,8333	-0,140	0,9587
S0097	4	0,6215	0,6486	0,5000	0,237	0,2759
SW72	2	0,1528	0,1594	0,1667	-0,048	1,0000
S0226	3	0,2882	0,3007	0,3333	-0,114	1,0000
SO090	5	0,6250	0,6522	0,7500	-0,158	0,2517
SW911	3	0,4479	0,4674	0,5833	-0,262	1,0000
S0002	3	0,6007	0,6268	0,4167	0,345	0,0742
SW200	2	0,2778	0,2899	0,3333	-0,158	1,0000
SW106	6	0,6840	0,7138	0,5000	0,309	0,0020**
S0101	2	0,4861	0,5072	0,5000	0,015	1,0000
UKUPNO	108	14,781	15,424	14,166	1,981	13,519
Prosječno	4,1538	0,5685	0,5932	0,5448	0,0761	0,587

*N= broj alela; $H_{exp=}$ očekivana heterozigotnost; H_{obs}= uočena heterozigotnost-; F_{is}= koeficijent križanja u bliskom srodstvu; F_{is}sign = značajna razlika F_{is} vrijednosti
P<0,001***, P<0,01**; P<0,05***

Tablica 26. Zbirni polimorfizmi za topigs (TP)

MS	N	H_{exp}	$H_{n,b}$	H_{obs}	F_{is}	F_{is}sign
S0026	2	0,4800	0,5053	0,2000	0,617	0,0818
S0155	3	0,3350	0,3526	0,4000	-0,143	1,0000
S0005	4	0,5350	0,5632	0,7000	-0,260	1,0000
SW24	2	0,4800	0,5053	0,8000	-0,636	0,1726
SW632	4	0,5350	0,5632	0,5000	0,118	0,1319
SWr19	4	0,6450	0,6789	0,6000	0,122	0,1857
SW241	3	0,4600	0,4842	0,6000	-0,256	1,0000
SW830	3	0,5450	0,5737	1,0000	-0,818	0,0073**
S0355	4	0,5350	0,5632	0,7000	-0,260	1,0000
SW936	5	0,7600	0,8000	1,0000	-0,268	0,3505
S0218	1	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
S0228	2	0,4950	0,5211	0,7000	-0,370	0,5205
SW240	3	0,2650	0,2789	0,3000	-0,080	1,0000
IGF1	4	0,5391	0,5750	0,5000	0,138	1,0000
SW240	2	0,4550	0,4789	0,5000	-0,047	1,0000
SW122	3	0,3950	0,4158	0,1000	0,769	0,0103**
SW857	3	0,5050	0,5316	0,5000	0,063	0,0706
S0097	5	0,7800	0,8211	1,0000	-0,233	0,0376*
SW72	3	0,2650	0,2789	0,3000	-0,080	1,0000
S0226	2	0,0950	0,1000	0,1000	0,000	-
SO090	5	0,7150	0,7526	0,6000	0,212	0,1150
SW911	3	0,5600	0,5895	0,8000	-0,385	0,6196
S0002	5	0,7100	0,7474	0,8000	-0,075	0,1444
SW200	2	0,4200	0,4421	0,6000	-0,385	0,4803
SW106	5	0,7400	0,7789	0,9000	-0,165	0,5802
S0101	5	0,6900	0,7263	1,0000	-0,406	0,0550
UKUPNO	87	12,939	13,627	15,2	-2,828	11,508
Prosječno	3,3461	0,4976	0,5241	0,5846	-0,1131	0,548

*N= broj alela; $H_{exp=}$ očekivana heterozigotnost; H_{obs}= uočena heterozigotnost-; F_{is}= koeficijent križanja u bliskom srodstvu; F_{is}sign = značajna razlika F_{is} vrijednosti
P<0,001***, P<0,01**; P<0,05***

Broj alela (N), očekivana (H_{exp}) i uočena heterozigotnosti (H_{obs}), koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F_{is}) te statistička značajnost F_{is} vrijednosti (F_{is}sign) za pietrain pasminu prikazani su u Tablici 24. Prosječan broj alela iznosio je 4,1538, dok je ukupan broj alela iznosio 108. Najveći broj alela, njih 10, zabilježeno je na lokusu S0005, dok je najmanje alela tek 2 zabilježeno na 7 lokusa (S0218, Sw240, Sw122, Sw72, Sw2008, S0101). Prosječne vrijednosti očekivane i zabilježene heterozigotnosti su iznosile 0,5685 te 0,5448. Statistička značajnost koeficijenta inbridinga je uočena na markerima S0218(P<0,001) i Sw106(P<0,01).

Broj alela (N), očekivana (H_{exp}) i uočena heterozigotnosti (H_{obs}), koeficijent križanja u bliskom srodstvu (F_{is}) te statistička značajnost F_{is} vrijednosti (F_{is}sign) za topigs svinje prikazani su u Tablici 26. Prosječan broj alela iznosio je 3,3461, dok je ukupan broj alela iznosio 87. Zabilježeno je 6 lokusa (Sw936, S0097, SO090, S0002, Sw106, S0101) sa po 5 alela što je i najveći broj alela po lokusu, dok je najmanji broj alela, tek 1, zabilježen na lokusu S0218. Prosječne vrijednosti očekivane i zabilježene heterozigotnosti su iznosile 0,4976 te 0,5846. Statistička značajnost koeficijenta inbridinga je uočena na markerima Sw830(P<0,01), Sw122(P<0,01) i S0097(P<0,05).

Vrijednosti očekivane i uočene heterozigotnost su važni parametri koji ukazuju na odabir markera pomoću kojih je moguće identificirati određenu pasminu. Za uspješnu identifikaciju pasmine, vrijednosti očekivane heterozigotnosti trebaju biti više od 0,5 – 0,6 (Botsteinetal., 1980). Vrijednosti očekivane i uočene heterozigotnosti kod crne slavonske pasmine koja je homozigot po genu *MC1R* bile su 0,6585 i 0,6538 dok su za križance dobivene vrijednosti očekivane i uočene heterozigotnosti iznosile 0,6421 i 0,6231. Dobivene vrijednosti očekivane heterozigotnosti za ostale pasmine koje su korištene u istraživanju su iznosile 0,4315 (durok), 0,5669 (landras), 0,6652 (PIC), 0,5685 (pietrain) i 0,4977 (topigs). Uočena heterozigotnost za durok pasminu iznosila je 0,5154, za velikog jorkšira 0,5821, landras 0,6308, PIC 0,6538, pietrain 0,5449 i topigs 0,5846. Rezultati istraživanja su ukazali da crna slavonska pasmina svinja ima veći stupanj genetske raznolikosti od ostalih pasmina koje su bile uključene u istraživanje. Kim i sur. (2005.) su istražili genetsku strukturu kineskih pasmina svinja uspoređujući ih s europskim pasminama pomoću seta od 16 mikrosatelitska markera. Vrijednosti očekivane i uočene heterozigotnosti za durok pasminu bile su 0,599 i 0,557 dok su kod landras pasmine uočene vrijednosti iznosile 0,702 za očekivanu heterozigotnost te 0,624 za uočenu heterozigotnost. Luetkemeier i sur. (2010.) su istražili genetsku strukturu 11 pasmina svinja pomoću 21 mikrosatelitnog markera. U istraživanje su bili uključene sljedeće pasmine: jorkšir, hempšir, landras, durok, erualian, laniju, meišan te tri

pasmine divljih svinja. Dobivene vrijednosti broja alela, očekivane i promatrane heterozigotnosti za durok pasminu su iznosile 0,65 i 0,59. Veliki jorkšir je imao vrijednosti očekivane heterozigotnosti 0,67 te uočene heterozigotnosti 0,54 dok su za pasminu landras izmjerene prosječne vrijednosti očekivane heterozigotnosti od 0,67 te uočene heterozigotnosti 0,65. Vrtkova i sur. (2012.) su istraživali genetsku strukturu tri populacije svinja (durok, pietrain, preštice) koristeći set od 10 mikrosatelitna lokusa. Vrijednosti uočene heterozigotnosti za durok i pietrain pasminu bile su 0,6406 i 0,5518, dok je vrijednost za preštice pasminu bila nešto viša te je iznosila 0,7154. Rezultati istraživanja su korelaciji s našin rezultatima gdje su dobivene vrijednosti za navedene pasmine bile 0,5154, 0,5449 i 0,6538. Kao i u navedenom istraživanju vrijednost promatrane heterozigotnosti kod crne slavonske pasmine (CS) bila je viša nego kod ostalih istraživanih pasmina što ukazuje na postojanje visoke razine genetske raznolikosti. Genetsku strukturu crne grčke svinje istražili su Michailidou i sur. (2012.). U istraživanju je korišten set od 12 mikrosatelitna lokusa. Očekivana heterozigotnost se kretala od 0,471 do 0,707 dok su vrijednosti uočene heterozigotnosti bile između -0,329 i 0,229. Gama i sur. (2013.) su istražili genetsku strukturu iberijske pasmine svinja te odnose i stupanj križanja s divljim pasminama svinja. U istraživanju je sudjelovalo 3 portugalske autohtone pasmine (altežano, bisaro i malhado) te 12 španjolskih autohtonih pasmina svinja. Za istraživanje je korišten set od 24 mikrosatelitska markera. Rezultati istraživanja su ukazali na prosječnu vrijednost očekivane heterozigotnosti 0,800 te uočene heterozigotnosti 0,718. Li i sur. (2014.) su istražili genetsku strukturu lanijlu kineske pasmine svinja uz set od 19 mikrosatelitska markera. U istraživanje su bile uključene i pasmine durok, landras i veliki jorkšir. Vrijednosti očekivane heterozigotnosti za navedene pasmine bile su 0,511, 0,512 i 0,513. Vrijednosti uočene heterozigotnosti iznosile su 0,473, 0,471 i 0,538. Istraživanje koje su proveli Revidatti i sur. (2014.) za cilj je imalo istražili genetski status kriolo pasmine uz set od 24 mikrosatelitska markera. Rezultati analize su ukazali na vrijednosti očekivane i uočene heterozigotnosti od 0,62 i 0,57. Pardo i sur. (2014.) su istražili genetsku raznolikost južnoameričke autohtone pasmine svinja, tierralta. Istraživanje je provedeno uz set od 20 mikrosatelitska markera. Prosječna vrijednost očekivane heterozigotnosti bila je 0,525 dok je prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti iznosila 0,510. Ayizanga i sur. (2016.) su istražili genetsku varijabilnost ganskih domaćih pasmina svinja. Istraživanje je provedeno uz set od 12 mikrosatelitskih markera. Referentna pasmina svinja u istraživanju je bio veliki jorškir. Prosječna vrijednost promatrane

heterozigotnosti bila je 0,774, dok je prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti iznosila 0,562.

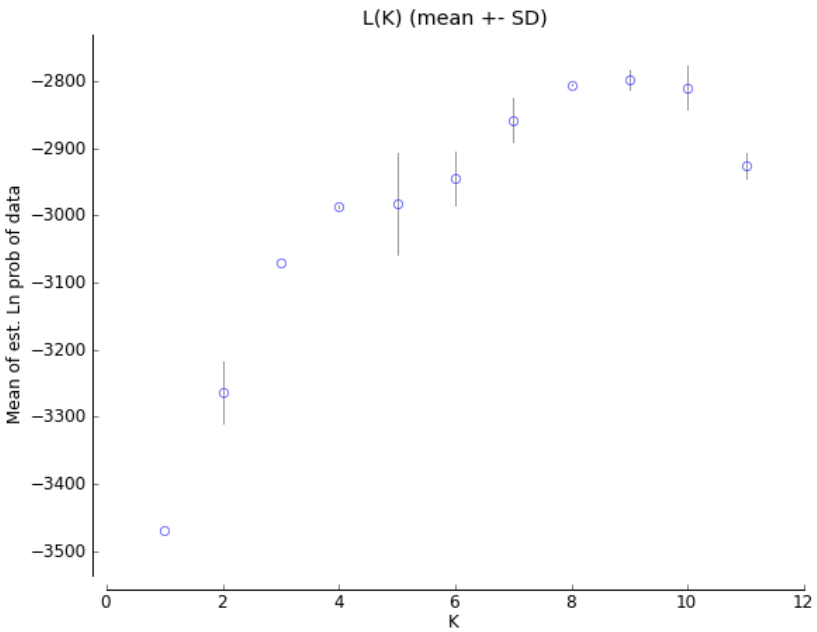
4.5. Autentifikacija proizvoda crne slavonske svinje

4.5.1. Autentifikacija proizvoda uz set od 9 mikrosatelitna markera

Nakon provedene statističke obrade odabran je set od 9 mikrosatelitna markera temeljem njihove polimorfnosti te s obzirom na zastupljenost privatnih alela po markeru koji su se pojavili kod pripadnika crne slavonske pasmine. Nadalje, mikrosateliti su odabrani s obzirom na veličinu fragmenata te na taj način grupirani u tri skupine združenih reakcija te obilježeni različitim bojama kako bi se tijekom daljnje analize spriječilo njihovo međusobno preklapanje. Odabrani set mikrosatelitnih markera prikazan je Tablicom 27. Autentifikacija pomoću odabranog seta mikrosatelita bila bi učinkoviti markerski sustav za sirovo meso te proizvode dobivene od pojedinačnih životinja, dok je za autentifikaciju kobasičarskih proizvoda potrebno razviti metodu kojom bi se moglo identificirati više od 5 životinja u proizvodu.

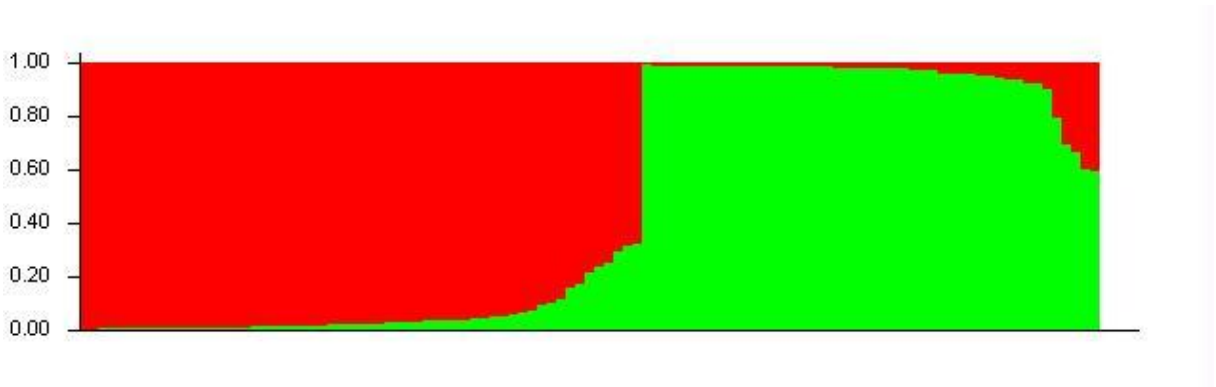
Tablica 27. Set od 9 mikrosatelitna markera korištenih za autentifikaciju

Mikrosateliti	Kromosom	Sekvenca početnice (5’ -> 3’)	Temperatura	Veličina fragmenta
S0026	16	F-AACCTTCCCTTCCCAATCAC CACAGACTGCTTTTTACTCC	55°C	87 - 105
S0155	1	F-TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG AAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT	55°C	142 - 162
S0005	5	F-TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCTGATTCTGGGTA	55°C	203 - 267
Sw2410	8	A-ATTTGCCCCCAAGGTATTTC CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	50°C	90 - 131
Sw830	10	A-AAGTACCATGGAGAGGGAAATG ACATGGTTCCAAAGACCTGTG	50°C	168 - 203
S0355	15	A-TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	50°C	244 - 271
Sw240	17	H-CTTTGGGTGGAGTGTGTGC ATCCAAATGCTGCAAGCG	55°C	95 - 124
Sw632	7	H-TGGGTTGAAAGATTTCCCAA GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA	55°C	148 - 178
Swr1941	13	H-AGAAAGCAATTTGATTTGCATAATC ACAAGGACCTACTGTATAGCACAGG	55°C	202 - 224



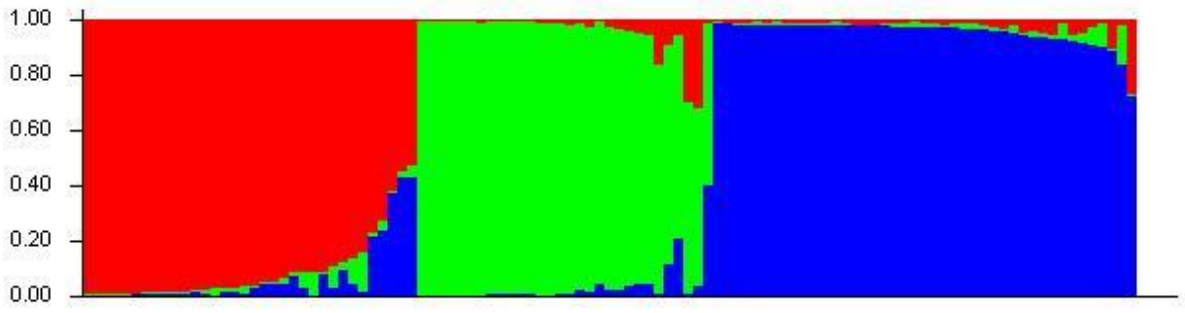
Graf 8 . Određivanje broja genetskih klastera K temeljem Evanno metode (2005.) uz set od 9 mikrosatelitna markera

Grafom 8. je prikazan rezultat strukturalne analize kojom se određuje stvaran broj genetskih klastera, K. Cilj optimizacije broja mikrosatelitnih markera je odrediti najmanji broj mikrosatelitnih markera potrebnih za identifikaciju pasmina u uzorku koji se analizira. Rezultati optimizacije na 9 mikrosatelitna markera ukazuje na postojanje 8 pasmina svinje što je sukladno s rezultatima dobivenima uz korištenje seta od 26 mikrosatelitna markera.



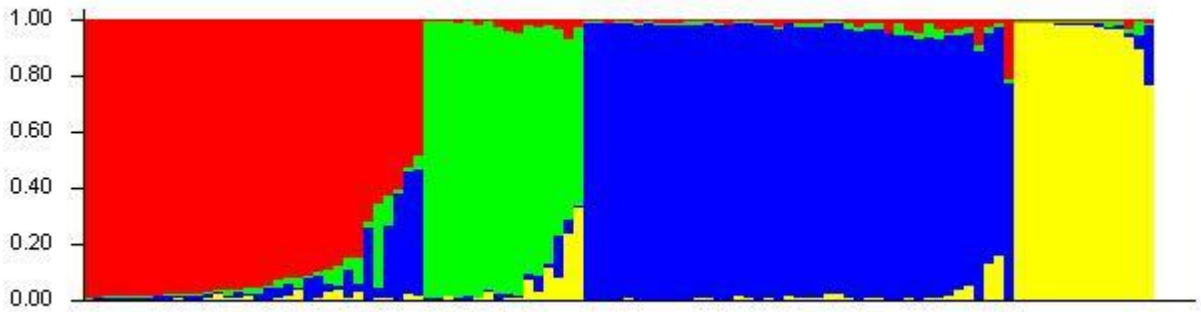
Slika 26. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=2

Slika 26. prikazuje rezultate STRUCTURE analize provedene uz set od 9 mikrosatelitna markera. Analizom je utvrđeno postojanje dvije populacije svinja. Analizom nije vidljiva pripadnost pojedinih populacija analiziranih pasmina svinja pojedinom klasteru.



Slika 27. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=3

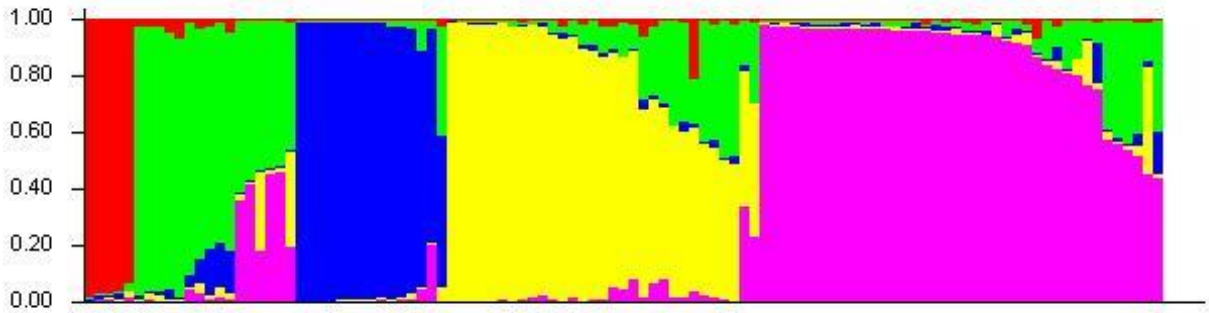
Slika 27. prikazuje rezultate STRUCTURE analize gdje je pretpostavljen broj genetskih klastera, K=3. Analizom je utvrđeno da prvi klaster čine PIC i pietrain pasmina, drugi genetski klaster čine durok, landras i jorkšir pasmina, dok su svinje crne slavonske pasmine grupirane u trećem genetskom klasteru.



Slika 28. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=4

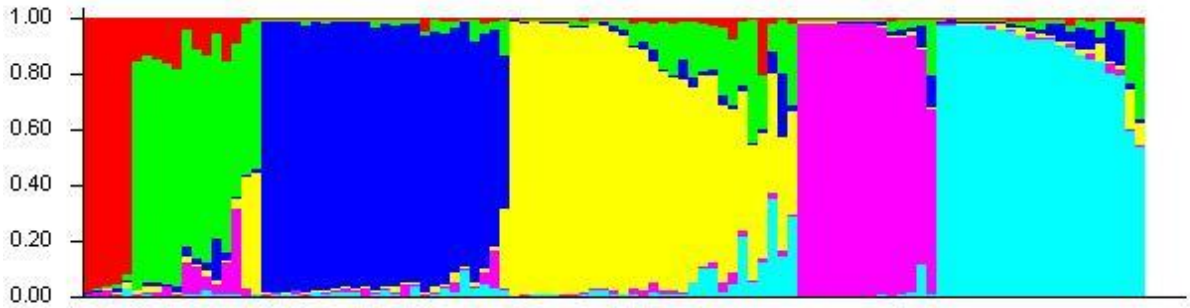
Slika 28. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K=4. Rezultati analize su ukazali da prvi genetski klaster čine PIC svinje te pietrain pasmina, drugi genetski klaster je zastupljen s pasminama durokom i landrasom dok su pripadnici velikog jorkšira podijeljeni između pripadnosti drugom i četvrtom

genetskom klasteru. Treći klaster čine svinje crne slavonske pasmine, dok su u četvrtom klasteru zastupljene jednim dijelom svinje pasmine veliki jorkšir te topigs svinje.



Slika 29. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=5

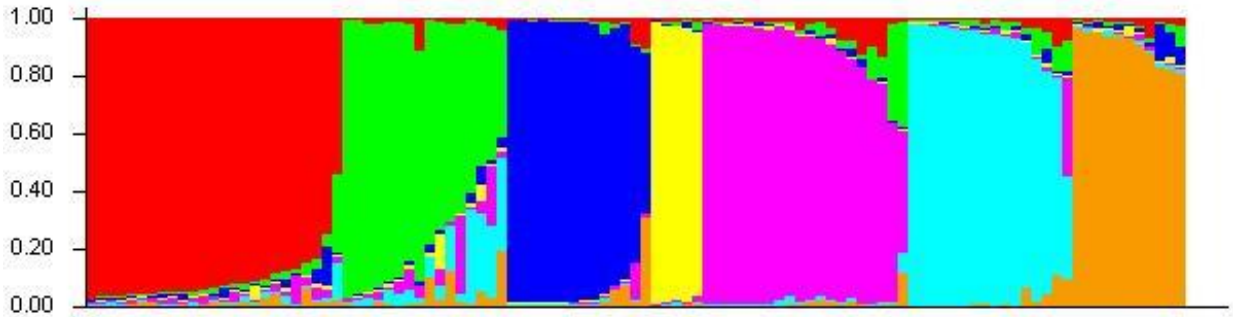
Slika 29. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K=5. Iz rezultata analize je vidljivo da se drugi klaster diferencirao na način da durok pasmina čini odvojeni klaster, tj. prvi genetski klaster dok drugi genetski klaster čine svinje landras pasmine te dio svinja pasmine velikog jorkšira. Nadalje, u drugom klasteru su manjim brojem zastupljeni i pripadnici križanaca crne slavonske pasmine za koje možemo pretpostaviti da su križani s jednom od navedenih pasmina pripadnika drugog klastera. Treći genetski klaster čine topigs svinje te drugi dio svinja velikog jorkšira. PIC svinje i pietrain čine četvrti klaster, dok su crne slavonske svinje grupirane u petom genetskom klasteru.



Slika 30. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=6

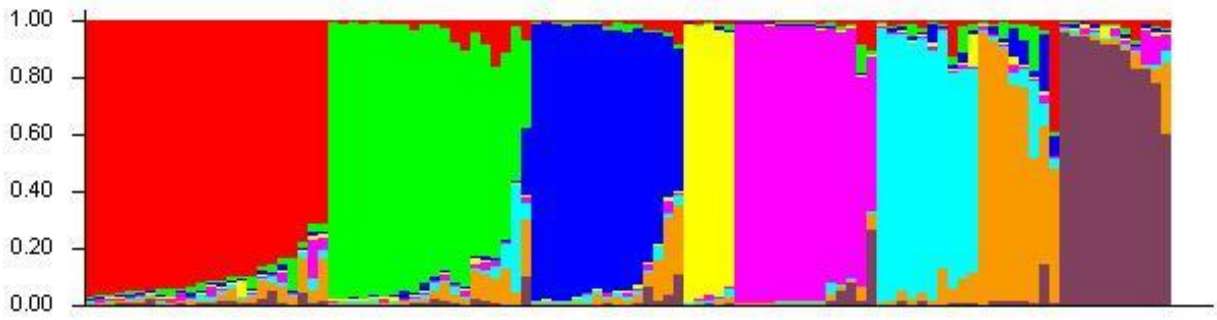
Slika 30. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K=6. Pripadnici durok pasmine su grupirani u prvom genetskom klasteru

dok se u drugom klasteru nalaze svinje landras pasmine te jednim dijelom pripadnici PIC-a i velikog jorkšira. Pri analizi uz K=6 došlo je do razdvajanja svinja crne slavonske pasmine na dva genetska klastera; pripadnici homozigota prema *MC1R* genu su grupirani u treći genetski klaster dok su pripadnici heterozigota prema *MC1R* genu grupirani u posljednjem, šestom genetskom klasteru. U četvrtom genetskom klasteru su smješteni pripadnici pietrain pasmine te dio PIC svinja, dok se u petom klasteru nalaze topigs svinje te dio svinja pripadnika pasmine veliki jorkšir.



Slika 31. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=7

Slika 31. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K=7. U prvom genetskom klasteru se nalaze crne slavonske svinje koje su homozigoti prema *MC1R* genu, dok su heterozigoti zastupljeni u 5 genetskom klasteru. PIC i pietrain svinje su u ovom stupnju analize razdvojeni u dva klastera tako da se u drugom klasteru nalaze PIC svinje, a pietrain svinje su grupirane u šestom genetskom klasteru. Treći genetski klaster čine topigs svinje i dio svinja pasmine velikog jorkšira. Durok pasmina je u četvrtom klasteru dok peti klaster čine svinje landras pasmine i dio svinja pasmine veliki jorkšir.



Slika 32. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera, K=8

Slika 32. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K= 8. Crne slavonske svinje koje su homozigoti prema *MC1R* genu se nalaze u prvom genetskom klasteru dok su heterozigoti, tj. križanci smješteni u drugom klasteru. Prisutnost križanaca je vidljiva i u sedmom klasteru. Treći klaster čine svinje pasmine pietrain dok se durok pasmina nalazi u četvrtom klasteru. Peti genetski klaster čine topigs svinje i jedan dio svinja pasmine veliki jorkšir. PIC svinje su smještene u šestom klasteru. Sedmi klaster čini dio PIC svinja te manji broj heterozigota crnih slavonskih svinja po *MC1R* genu, dok su u sedmom klasteru svinje landras pasmine i drugi dio svinja pasmine veliki jorkšir.

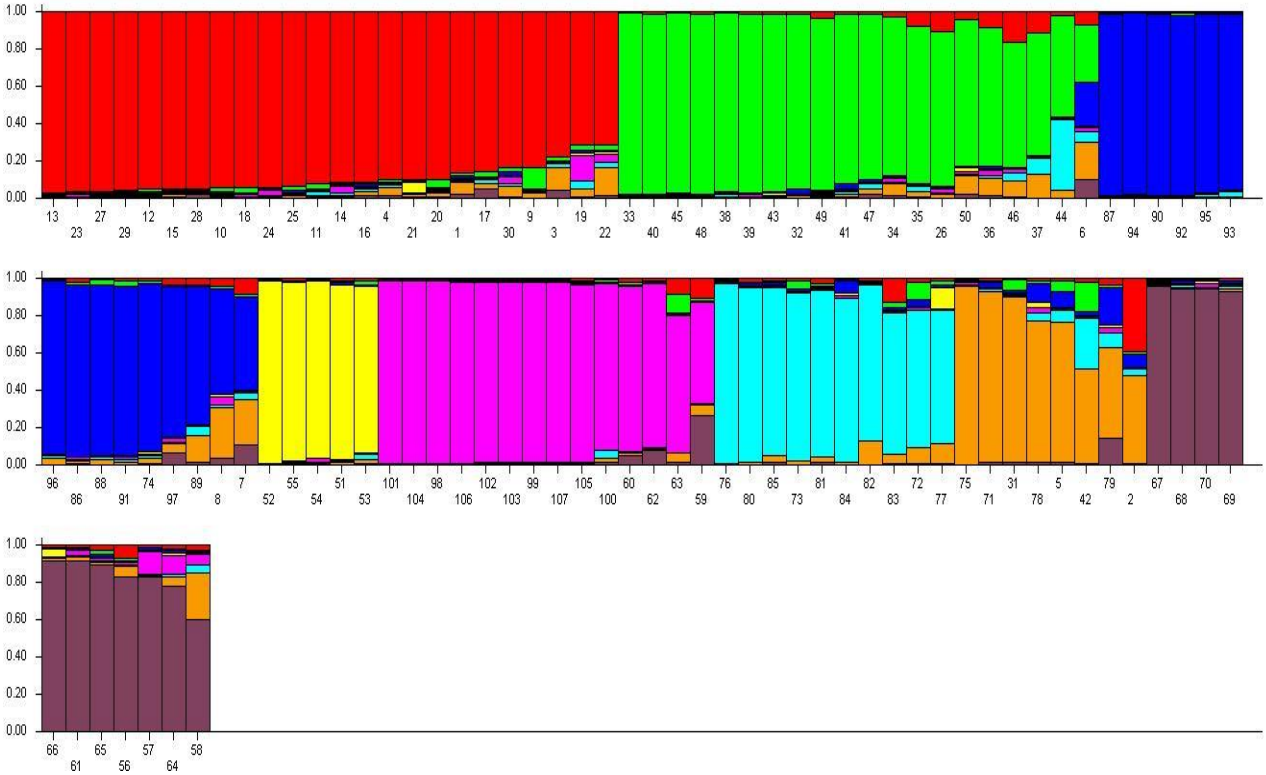
Tablica 28. Udio svinja homozigota i heterozigota u pojedinim genetskim klasterima pri K=8 uz analizu pomoću 9 mikrosatelitnih markera

	Klaster							
Pasmina	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
CS	0,863	0,009	0,019	0,005	0,006	0,011	0,061	0,027
CS	0,899	0,012	0,007	0,004	0,003	0,017	0,042	0,016
CS	0,831	0,114	0,006	0,003	0,006	0,011	0,023	0,007
CS	0,942	0,021	0,006	0,005	0,008	0,004	0,008	0,006
CS	0,921	0,026	0,005	0,006	0,005	0,017	0,012	0,009
CS	0,947	0,014	0,006	0,004	0,005	0,008	0,008	0,007
CS	**0,968**	0,006	0,005	0,002	0,004	0,004	0,006	0,004
CS	0,911	0,008	0,007	0,004	0,040	0,010	0,010	0,011
CS	0,945	0,010	0,005	0,003	0,006	0,007	0,010	0,014
CS	0,711	0,031	0,010	0,013	0,136	0,044	0,041	0,016
CSX	0,006	**0,057**	0,015	0,005	0,004	0,011	0,885	0,017
CSX	0,007	0,963	0,005	0,004	0,003	0,009	0,005	0,004
CSX	0,013	0,886	0,009	0,004	0,003	0,032	0,030	0,024
CSX	0,011	0,962	0,004	0,004	0,003	0,005	0,006	0,006
CSX	0,035	0,921	0,006	0,005	0,005	0,008	0,010	0,009
CSX	0,038	0,785	0,006	0,021	0,015	0,013	0,100	0,020
CSX	0,012	0,948	0,008	0,012	0,005	0,005	0,008	0,003
CSX	0,023	0,851	0,005	0,011	0,018	0,011	0,060	0,021
CSX	0,007	**0,967**	0,004	0,003	0,006	0,005	0,005	0,003
CSX	0,008	0,942	0,022	0,004	0,003	0,006	0,010	0,004

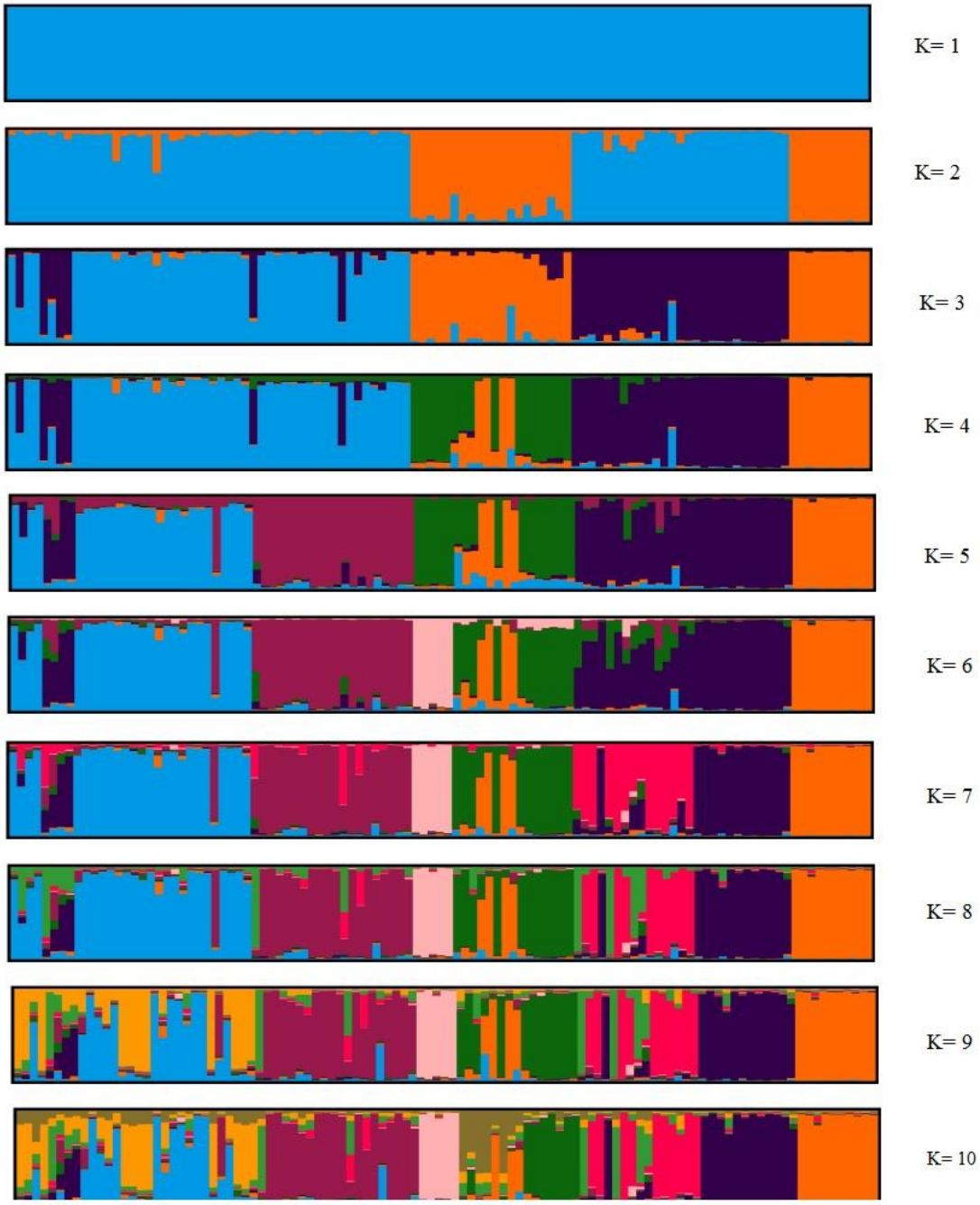
CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu

Tablicom 28. su prikazani udjeli 10 svinja koje su homozigotne prema *MC1R* te 10 svinja koje su heterozigotne prema *MC1R* genu pri K= 8 uz analizu pomoću 9 mikrosatelitnih markera. Iz tablice se može vidjeti prisutnost svake jedinke u pojedinom genetskom klasteru. Svinje koje pripadaju skupini homozigota prema *MC1R* genu su grupirane u prvom genetskom klasteru na što nam ukazuju vrijednosti od najmanje 0,711 do najviše 0,968, tj. pripadnost homozigotima od 71,1 % do 96,8%. Ostali postotni udio u svakoj jedinki je podijeljen između ostalih genetskih klastera. Svinje koje su heterozogoti prema *MC1R* genu su grupirane u drugom genetskom klasteru na što ukazuju najmanja i najviša vrijednost, a koje

se kreću od 0,056, tj. 5,6 % do 0,967, tj. 96,7 %. Slikom 33. je prikazana svaka jedinka unutar populacije te udio pojedinih pasmina unutar svake jedinke.



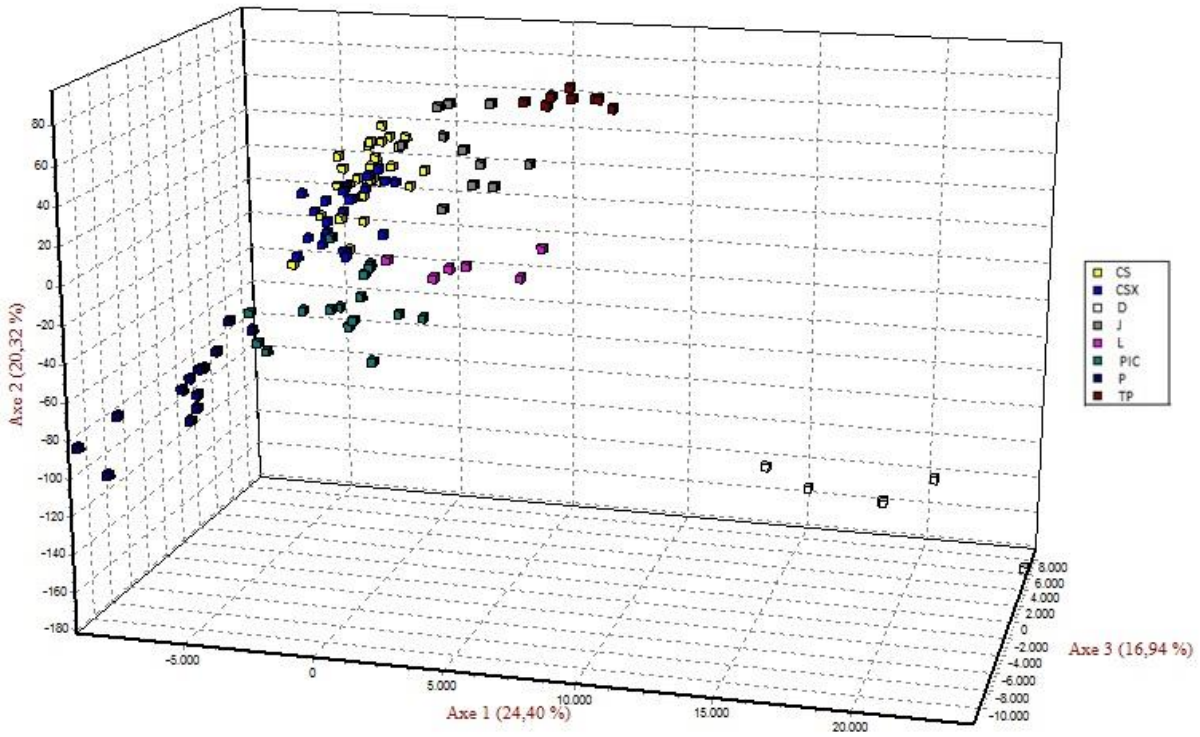
Slika 33. Analiza strukture populacija s 9 mikrosatelitskih markera pri K=8 uz prikaz svake analizirane jedinke u populacijama



Slika 34. Rezultati STRUCTURE uz 9 mikrosatelitskih markera vizualizirani Clumpak programskim paketom

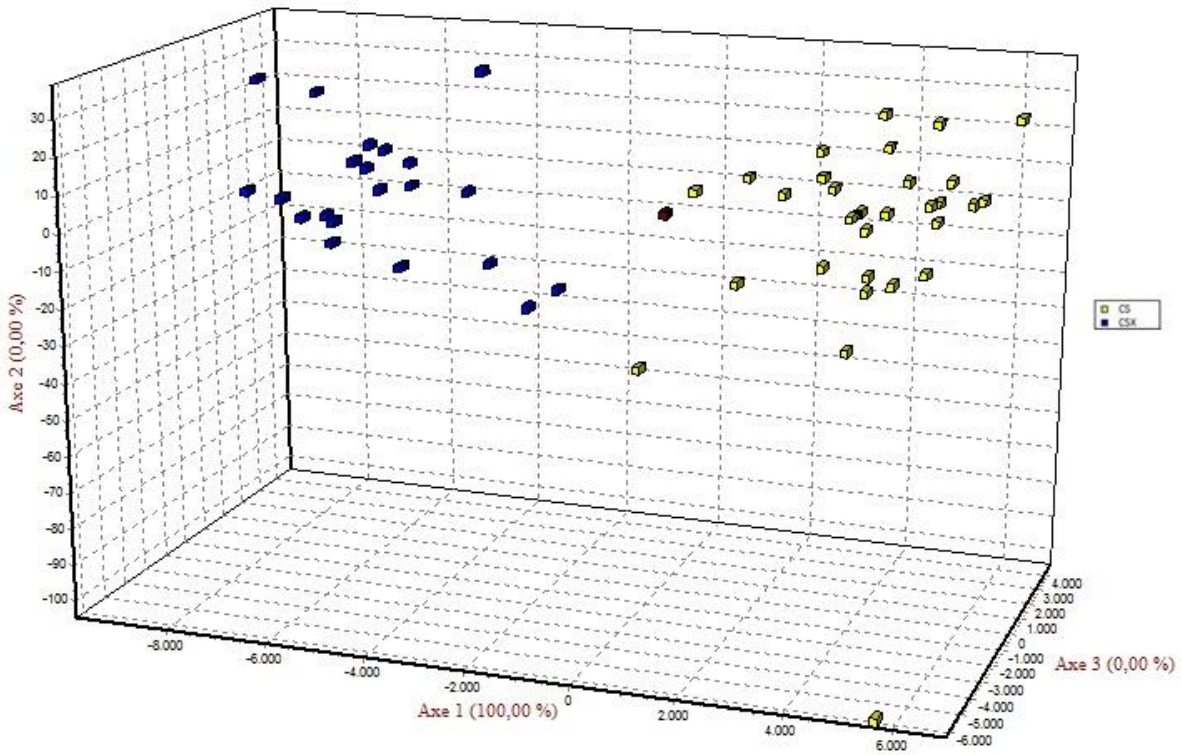
Vizualizacija rezultata dobivenih STRUCTURE programom je odrađena Clumpak programskim paketom (Kopelman i sur., 2015.). Rezultati obrade podataka Clumpak programom potvrđuju rezultate genetske analize u STRUCTURE programu (Slika 33., Slika 34.). Rezultati dobiveni analizom pomoću 9 mikrosatelitskih markera ukazuje na to da je

odabrani set markera dovoljno učinkovit za razdvajanje svih pasmina svinja te posebno crnih svinja u dva genetska klastera s obzirom na to pripadaju li oni križancima ili homozigotima prema *MC1R* genu. Rasipanje rezultata je vidljivo pri K=9 što ukazuje na to da rezultati analize pri postojanju devet populacija svinja više nisu pouzdani. Grafom 9. je prikazana faktorijalna analiza korespondencije za ispitivane pasmine svinja uz set od 9 mikrosatelitska markera. Položaj ispitivanih populacija je jasno naznačen te je moguće uočiti razdvajanje dvije skupina crne slavonske pasmine svinja od ostalih pasmina. Ukupna varijabilnost na prvoj osi iznosi 24,40 %, na drugoj osi je 20,32 % te na trećoj osi 16,94 %. Graf 10. prikazuje analizu populacije crne slavonske pasmine gdje se dvije skupine svinja koje pripadaju skupinama hetezogigota i homozigota po *MC1R* genu jasno razdvajaju u dvije skupine.



Graf 9. Faktorijalna analiza korespondencije za ispitivane pasmine svinja uz set od 8 mikrosatelitska markera

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs)



Graf 10. Faktorijalna analiza korespondencije za crnu slavonsku pasminu svinja uz set od 8 mikrosatelitska markera

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu)

Iz rezultata provedene analize proizlazi zaključak da je odabrani set od 9 mikrosatelitskih markera dovoljno učinkovit za razdvajanje pasmina te homozigota i heterozigota po *MC1R* genu u odvojene klastere. Navedenom metodom je moguće identificirati životinje u proizvodima koji su dobiveni od isključivo jedne svinje (pršut, šunka).

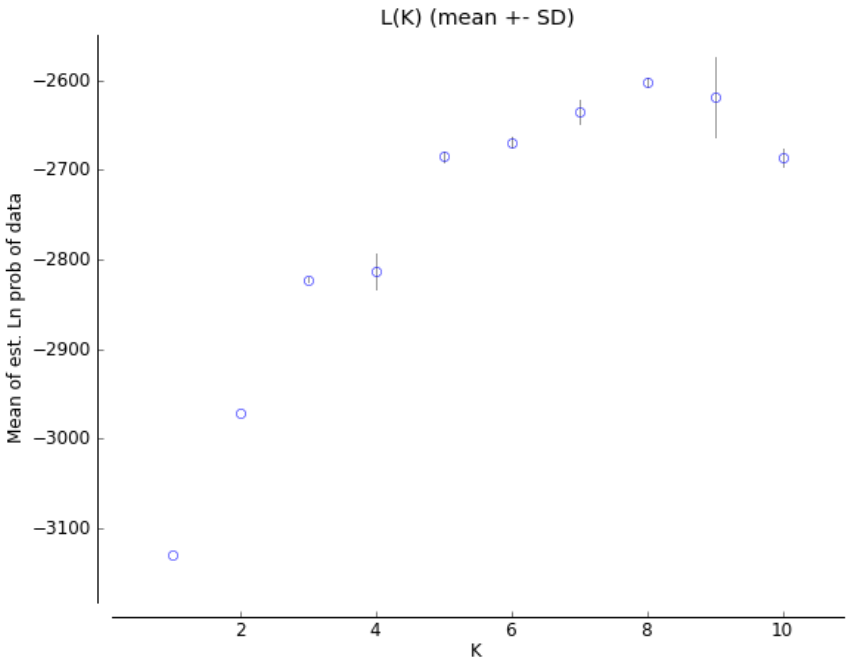
4.5.2 Autentifikacija proizvoda uz set od 8 mikrosatelitna markera

Daljnji postupak analize odnosio se na smanjivanje broja mikrosatelitskih markera za jedan marker pri svakom sljedećem koraku analize. Pristupilo se metodi isključivanja markera kako bi se došlo do minimalnog broja markera dovoljnih za genetsku identifikaciju pasmine. Markeri su odabrani s obzirom na stupanj polimorfnosti i broj privatnih alela zastupljenih po pojedinom markeru.

Tablica 29. Set od 8 mikrosatelitna markera korištenih pri autentifikaciji

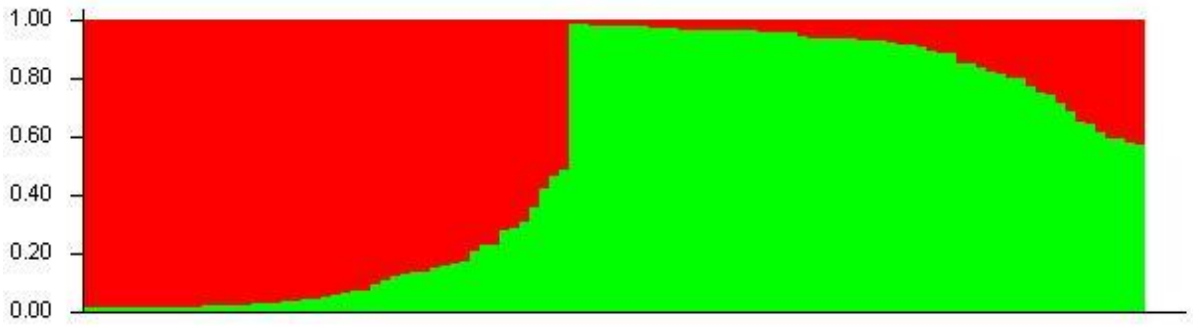
Mikrosateliti	Kromosom	Sekvenca početnice (5' -> 3')	Temperatura	Veličina fragmenta
S0026	16	F-AACCTTCCCTTCCCAATCAC CACAGACTGCTTTTTACTCC	55°C	87 - 105
S0155	1	F-TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG AAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT	55°C	142 - 162
S0005	5	F-TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCTGATTCTGGGTA	55°C	203 - 267
Sw2410	8	A-ATTTGCCCCCAAGGTATTTC CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	50°C	90 - 131
Sw830	10	A-AAGTACCATGGAGAGGGAAATG ACATGGTTCCAAAGACCTGTG	50°C	168 - 203
S0355	15	A-TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	50°C	244 - 271
Sw240	17	H-CTTTGGGTGGAGTGTGTGC ATCCAAATGCTGCAAGCG	55°C	95 - 124
Sw632	7	H-TGGGTTGAAAGATTTCCCAA GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA	55°C	148 - 178

Iz analize je isključen mikrosatelitni marker SW1941 zbog toga što na njemu nije bilo identificiranih privatnih alela, a ujedno je imao i najmanji broj alela u odnosu na ostale mikrosatelitne markere iz združene PCR reakcije. Popis markera uključenih u sljedeći korak analize prikazan je Tablicom 29.



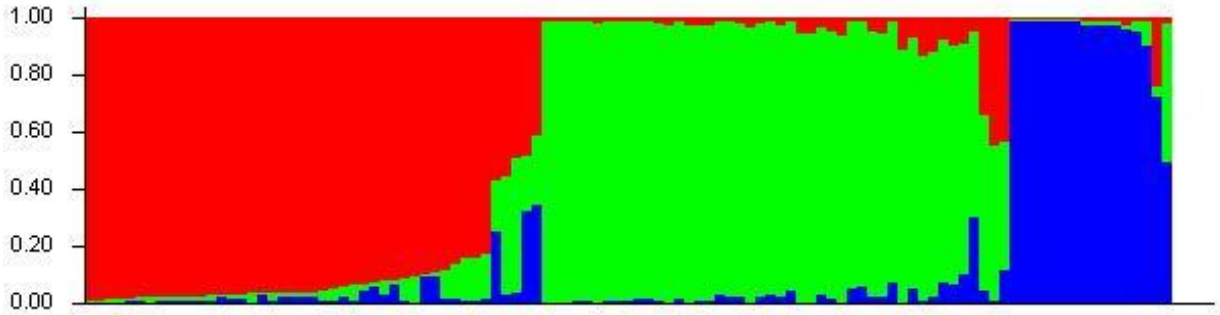
Graf 11. Određivanje broja genetskih klastera K temeljem Evanno metode (2005.) uz set od 8 mikrosatelitna markera

Nakon provedene STRUCTURE analize pristupilo se obradi podataka programskim paketom Structure Harvester (Dent i vanHoldt, 2012.). Cilj provedene analize bio je potvrditi stvarnu vrijednost broja klastera K koju je predvidio programski paket STRUCTURE. Iz Grafa 11. vidljivo je postojanje 8 genetskih klastera, K=8.



Slika 35. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=2

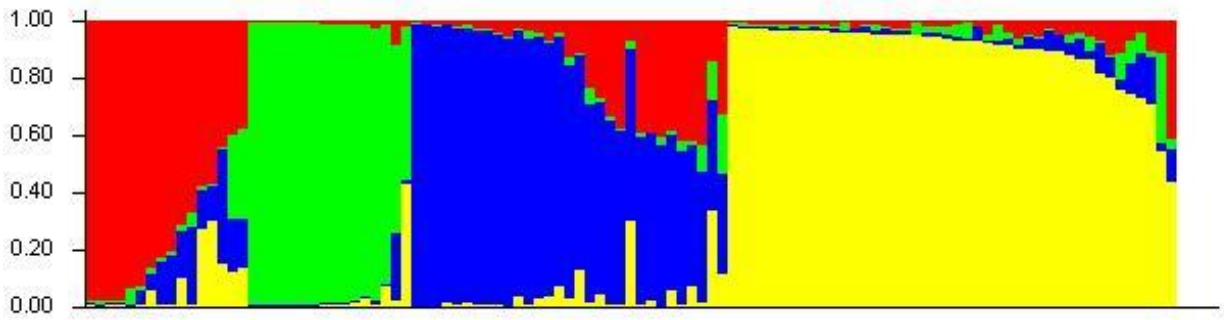
Slika 35. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K=2. Pasmine svinja su podijeljene u dva genetska klastera od kojih prvom klasteru pripadaju pasmine topigs, veliki jorkšir i crna slavonska svinja, dok su u drugi genetski klaster smještene pasmine durok, PIC, landras i pietren.



Slika 36. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=3

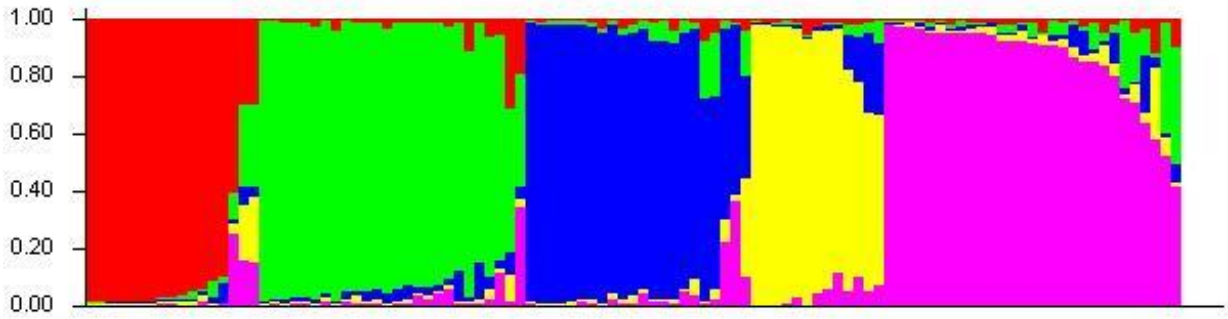
Slika 36. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K=3. U ovom dijelu analize je došlo do razdvajanja crne slavonske pasmine u odvojeni genetski klaster no nije poznato pripadaju li svinje homozigotima ili

heterozigotima prema *MC1R* genu. Durok, landras, PIC i pietren čine prvi genetski klaster dok su veliki jorkšir i topigs smješteni u trećem genetskom klasteru.



Slika 37. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=4

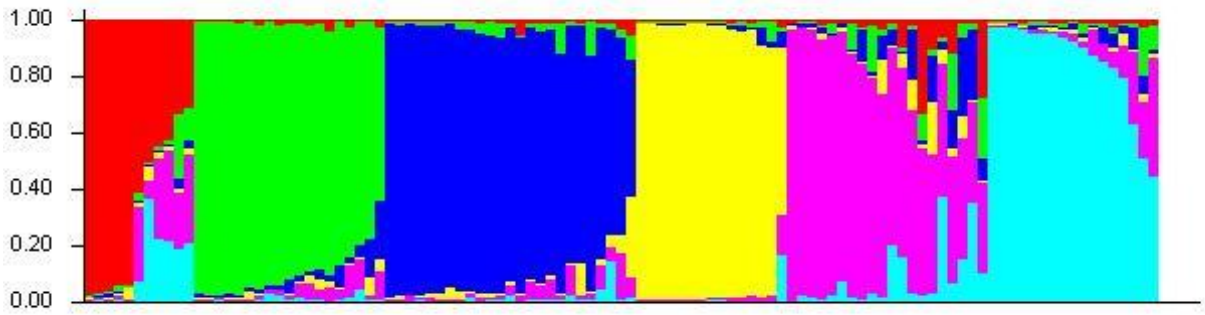
Slika 37. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K=4. U prvom genetskom klasteru se nalaze pasmine durok te manjim udjelom PIC i landras dok je analizom utvrđeno prisustvo topigs svinja i velikog jorkšira u drugom klasteru. U trećem genetskom klasteru se nalaze svinje pietren pasmine te drugi dio PIC svinja i landras pasmine. Svinje crne slavonske pasmine su grupirane u četvrtom genetskom klasteru.



Slika 38. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=5

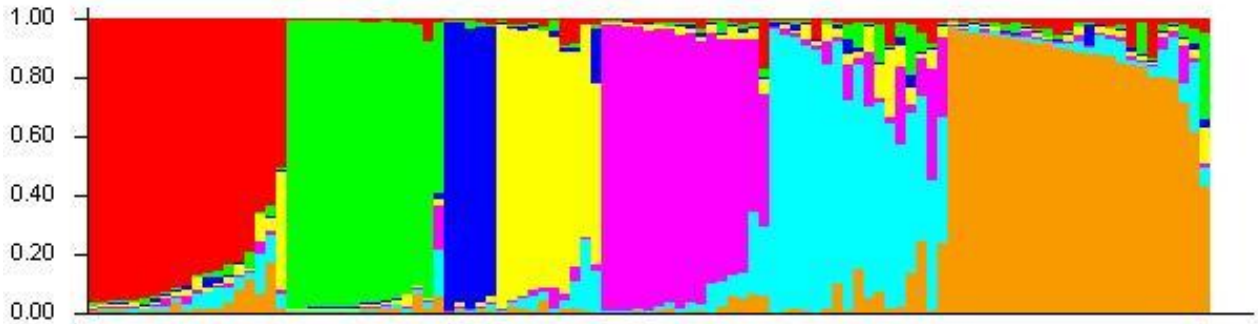
Slika 38. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K=5. U ovom dijelu analize je uočeno razdvajanje crne slavonske pasmine u dva odvojena klastera tako da se u drugom klasteru nalaze svinje koje su homozigoti prema *MC1R* genu, dok su u trećem genetskom klasteru heterozigoti prema *MC1R* genu, tj. križanci.

U prvom genetskom klasteru su pripadnici topigsa te svinje pasmine veliki jorškir. Durok pasmina te dio PIC svinja se nalaze u četvrtom genetskom klasteru, a u petom su smješteni pripadnici landras i pietren pasmine te jednim dijelom PIC svinje.



Slika 39. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=6

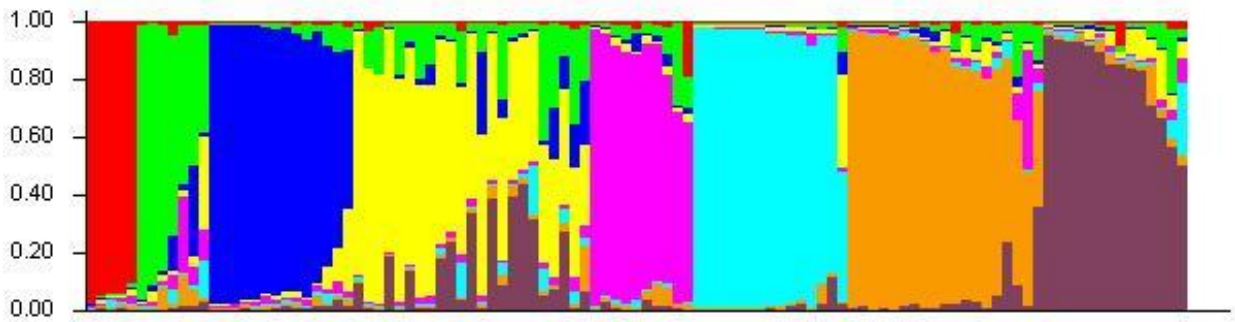
Slika 39. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K=6. Analizom je utvrđeno prisustvo durok pasmine i dijela PIC svinja u prvom genetskom klasteru, dok se crne svinje nalaze u drugom i trećem genetskom klasteru. Dio svinja pasmine veliki jorkšir te durok pasmina se nalaze u četvrtom genetskom klasteru. U petom genetskom klasteru se nalaze svinje landras pasmine te dio PIC svinja i velikog jorkšira. Svinje piteren pasmine se nalaze u šestom genetskom klasteru.



Slika 40. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=7

Slika 40. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K= 7. Rezultati analize su ukazali na to da se u prvom genetskom klasteru nalaze pripadnici crne slavonske svinje koji su heterozigoti prema *MC1R* genu. U drugom klasteru su zastupljene topigs svinje i dijelom svinje pasmine veliki jorkšir dok je durok

pasmina prisutna u trećem genetskom klasteru. Četvrti klaster čine PIC svinje, a u petom je utvrđena prisutnost pietrena. U šestom genetskom klasteru se nalaze svinje landras pasmine i dio svinja velikog jorkšira. Posljednji, sedmi klaster većim dijelom je zastupljen sa svinjama crne slavonske pasmine, no njihova prisutnost je zabilježena i kod ostalih genetskih klastera, prvenstveno je to slučaj kod šestog klastera.



Slika 41. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 8 mikrosatelitskih markera, K=8

Slika 41. prikazuje rezultate STRUCTURE analize u kojoj je pretpostavljeni broj genetskih klastera, K= 8. Svinje crne slavonske pasmine najvećim se dijelom nalaze u četvrtom i osmom razredu no njihova prisutnost je uočljiva i u drugim genetskim klasterima. U prvom klasteru se nalazi durok pasmina dok je u drugom klasteru zastupljen jedan dio velikog jorkšira. Svinje pietren pasmine se nalaze u trećem genetskom klasteru, a četvrtom genetskom klasteru se nalaze svinje landras pasmine te dio svinja velikog jorkšira. PIC svinje su uočene u petom genetskom klasteru, dok su u šestom genetskom klasteru prisutne topigs svinje. U sedmom genetskom klasteru se uočavaju crne slavonske svinje koje su heterozigoti prema *MC1R* genu dok su u osmom klasteru prisutne crne slavonske svinje koje su homozigoti prema *MC1R* genu. S obzirom na to da je pri daljnjem diferenciranju na 9 genetskih klastera došlo do rasipanja rezultata i nemogućnosti čitanja, pretpostavka je postojanje 8 klastera, tj. populacija u ispitivanom uzorku.

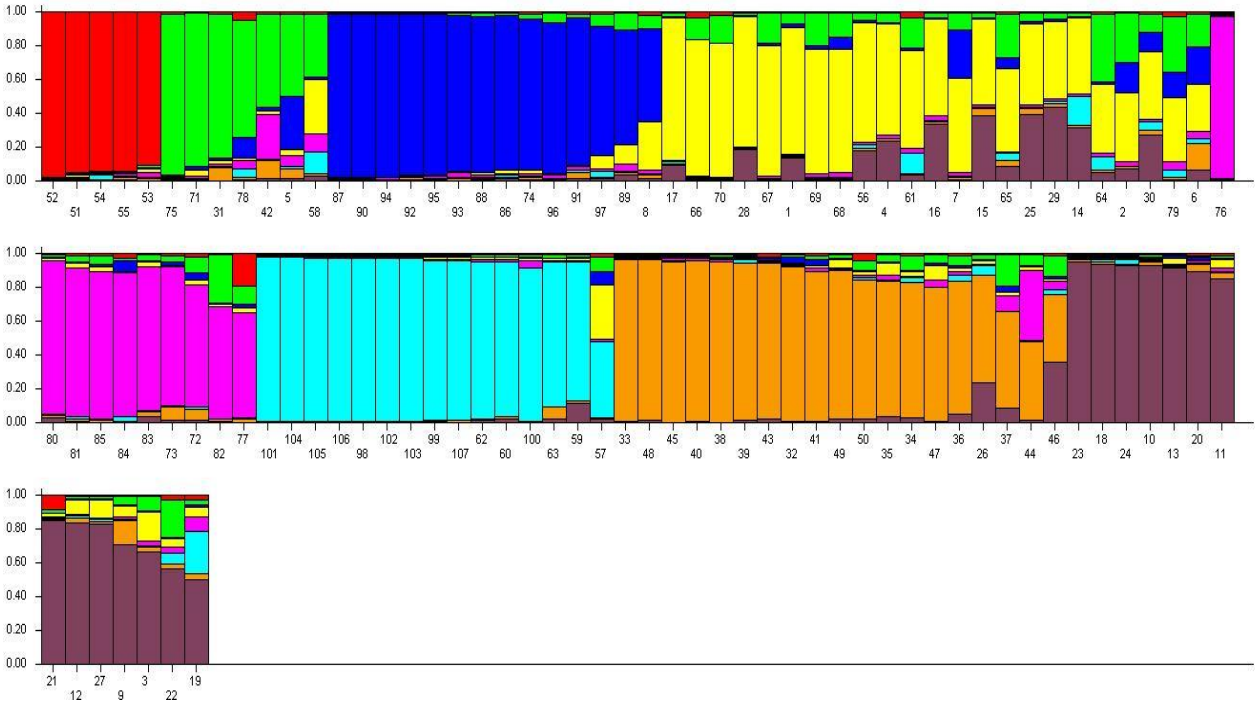
Tablica 30. Udio svinja homozigota i heterozigota u pojedinim genetskim klasterima pri K=8 uz analizu pomoću 8 mikrosatelitna markera

	Klaster							
Pasmina	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
CS	0,006	0,065	0,018	0,747	0,008	0,008	0,010	0,137
CS	0,005	0,290	0,182	0,404	0,027	0,006	0,010	0,075
CS	0,007	0,009	0,007	0,010	0,005	0,009	0,023	0,930
CS	0,008	0,019	0,006	0,048	0,023	0,008	0,034	0,854
CS	0,006	0,013	0,007	0,082	0,013	0,008	0,029	0,843
CS	0,003	0,011	0,011	0,036	0,007	0,006	0,009	0,917
CS	0,005	0,021	0,009	0,450	0,012	0,170	0,013	0,320
CS	0,005	0,007	0,005	0,007	0,005	0,017	0,014	0,942
CS	0,027	0,219	0,011	0,046	0,038	0,059	0,031	0,569
CS	0,027	0,219	0,011	0,046	0,038	0,059	0,031	0,569
CSX	0,003	0,187	0,037	0,016	0,094	0,004	0,573	0,085
CSX	0,008	0,550	0,022	0,027	0,260	0,005	0,112	0,017
CSX	0,005	0,051	0,011	0,088	0,040	0,004	0,791	0,010
CSX	0,037	0,062	0,005	0,020	0,016	0,016	0,821	0,023
CSX	0,007	0,017	0,008	0,049	0,010	0,008	0,876	0,025
CSX	0,009	0,107	0,118	0,396	0,014	0,052	0,030	0,274
CSX	0,008	0,854	0,015	0,020	0,015	0,005	0,077	0,006
CSX	0,004	0,042	0,008	0,068	0,035	0,004	0,803	0,037
CSX	0,012	0,059	0,009	0,027	0,020	0,032	0,788	0,052
CSX	0,005	0,029	0,008	0,017	0,009	0,056	0,636	0,240

CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu

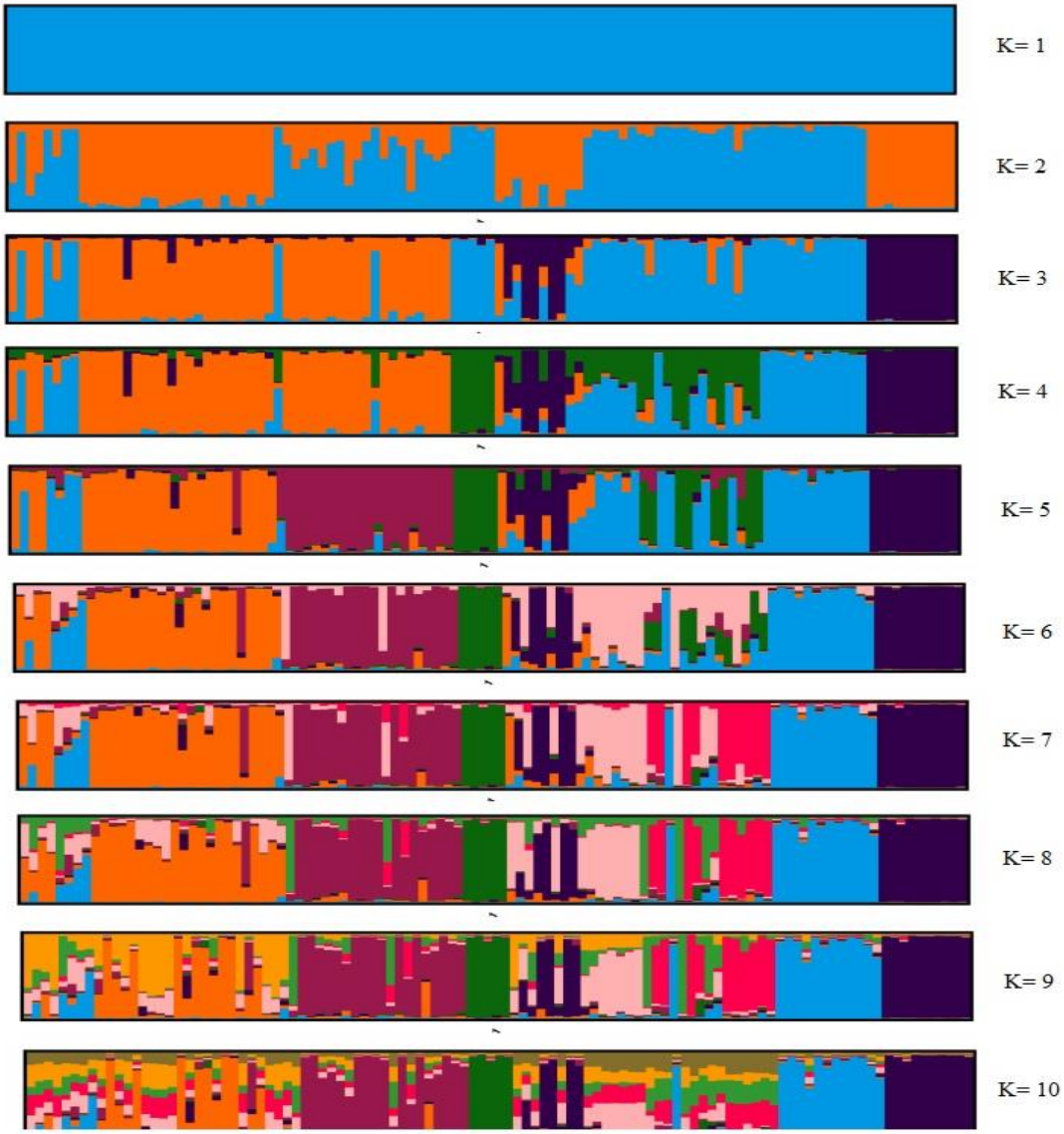
Tablicom 30. su prikazani udjeli 10 svinja koje su homozigoti prema *MC1R* te 10 svinja koje su heterozigoti prema *MC1R* genu pri K= 8 uz analizu pomoću 8 mikrosatelitnih markera. Iz podataka vidljivih u tablici proizlazi zaključak da analizom pomoću seta od 8 mikrosatelitskih markera identifikacija jedinki nije precizna kao što je to slučaj pri analizi uz set od 9 mikrosatelitna markera. Crne slavonske svinje koje su homozigoti prema *MC1R* genu su grupirane većim dijelom u 8 genetskom klasteru, no izražena je njihova prisutnost i ostalim klasterima što se vidi kod jedinke koja ima tek 0,085, tj. 8,5 % pripadnost ovom genetskom klasteru. Crne slavonske svinje koje su heterozigoti prema *MC1R* genu su grupirane većim

dijelom u sedmom genetskom klasteru. Najmanja pripadnost klasteru iznosi tek 0,077 ili 7,7 % dok je najviša vrijednost 0,876 ili 87,6 %.



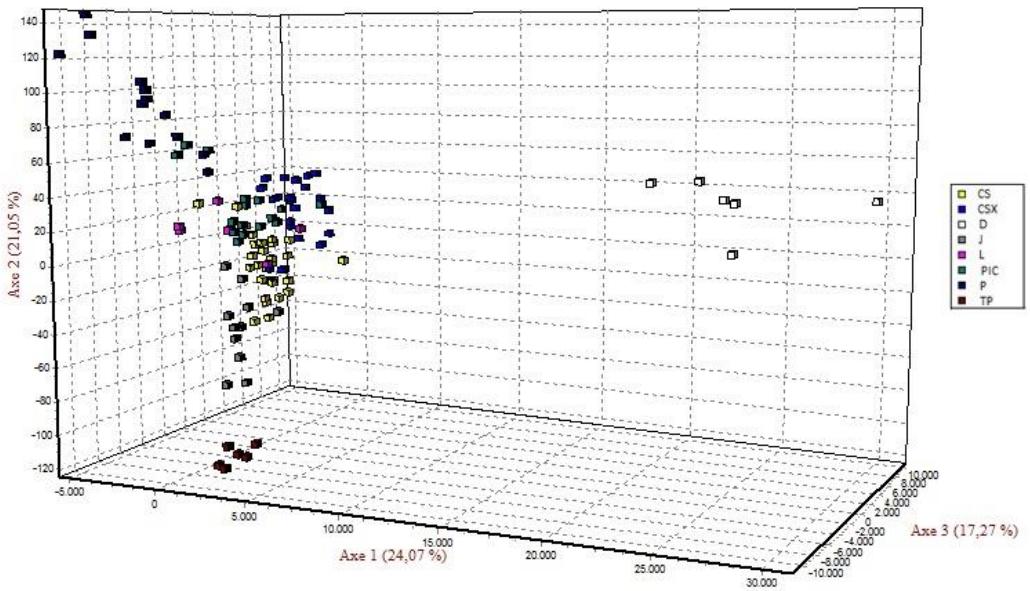
Slika 42. Analiza strukture populacija s 8 mikrosatelitskih markera pri K=8 uz prikaz svake analizirane jedinke u populacijama

Slikom 42. je prikazana svaka jedinka unutar populacije te udio pojedinih pasmina unutar svake jedinke. Iz slike je jasno vidljivo miješanje jedinki unutar populacija svinja pri analizi uz set od 8 mikrosatelitna markera. Vizualizacija rezultata dobivenih STRUCTURE programom je odrađena Clumpak programskim paketom (Kopelman i sur., 2015.). Rezultati obrade podataka Clumpak programom potvrđuju rezultate genetske analize u STRUCTURE programu (Slika 43.). Rezultati dobiveni analizom uz 8 mikrosatelitskih markera ukazuje na to da uz odabranih 8 mikrosatelitskih lokusa razdvajanje pasmina nije učinkovito kao što je to u slučaju analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera. Iako je razdvajanje pasmina vidljivo ne može se dovoljno precizno naznačiti granica razdvajanja crne slavonske pasmine na dva genetska klastera što ovu metodu analize čini manje pouzdanu u odnosu na analizu uz 9 mikrosatelitna markera.



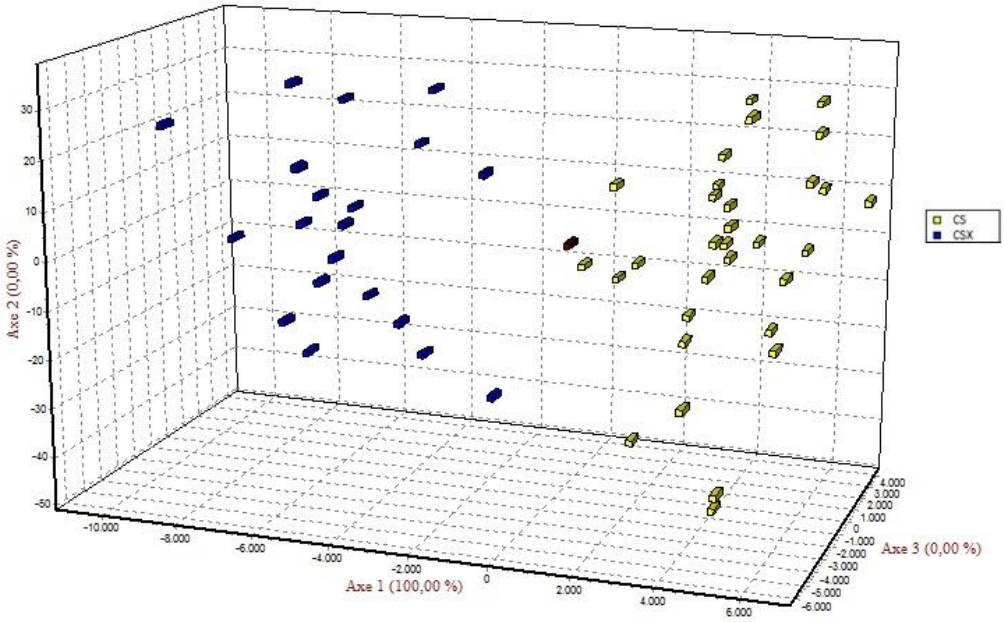
Slika 43. Rezultati STRUCTURE uz 8 mikrosatelitskih markera vizualizirani Clumpak programskim paketom

Grafom 12. je prikazana faktorijalna analiza korespondencije za ispitivane pasmine svinja uz set od 8 mikrosatelitska markera. Položaj ispitivanih populacija je jasno naznačen no nije vidljivo jasno razdvajanje dvije skupina crne slavonske pasmine svinja od ostalih pasmina. Ukupna varijabilnost na prvoj osi iznosi 24,07%, na drugoj osi je 21,05% te na trećoj osi 17,27%. Graf 13. prikazuje analizu populacije crne slavonske pasmine gdje se dvije skupine svinja koje su heterozigoti i homozigoti po *MC1R* genu jasno razdvajaju u dvije skupine.



Graf 12. Faktorijalna analiza korespondencije za ispitivane pasmine svinja uz set od 8 mikrosatelitska markera

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs)



Graf 13. Faktorijalna analiza korespondencije za crnu slavonsku pasminu svinja uz set od 8 mikrosatelitska markera

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu)

4.5.3. Autentifikacija proizvoda uz set od 5 mikrosatelitna markera

Dosadašnji tijek analize i smanjivanje broja mikrosatelitskih markera temeljio se na vrijednostima njihove polimorfnosti te broju privatnih alela koji su prethodno utvrđeni za svaki lokus. Sljedeći korak analize uključivao je smanjivanje broja markera temeljem prethodna dva kriterija te izračunom vrijednosti vjerojatnosti identiteta (eng. match probability, MP) svakog lokusa za 8 ispitivanih populacija. Temeljem izračunate MP vrijednosti odabran je set od 5 mikrosatelitskih markera koji su dovoljno informativni da bi se mogli koristit kao markerski sustav za identifikaciju jedinki koje pripadaju skupini crne slavonske pasmine te autentifikaciju proizvoda (Tablica 31.). MP vrijednosti su izračunate po formuli prema Weir (1996.) te Arana i sur. (2002.) u programskom paketu R *ad hoc* napisanom skriptom. Izračun MP vrijednosti temelji se na vjerojatnost pronalaska dvije jedinke u populaciji koje dijele isti genotip uzimajući pritom u obzir omjer vjerojatnosti (eng. likelihood ratio, LR). Prema Weir i Cockerham (1984.) θ vrijednost je jednaka FST vrijednostima te je stoga za svaku populaciju izračunata FST vrijednost (Tablica 32.). MP vrijednost je izračunata za svaki marker pojedinačno, uzimajući u obzir frekvencije svih alela koji se nalaze na ispitivanim markerima. Izračun je proveden prvo za sve populacije svinja, a zatim samo za populaciju crne slavonske svinje (n=50) kako bi se utvrdilo hoće li analiza pokazati diferenciranje pasmine crne slavonske svinje na dvije skupine (CS, CSX).

Tablica 31. Set od 5 mikrosatelitna markera korištenih pri autentifikaciji

Mikrosateliti	Kromosom	Sekvenca početnice (5’ -> 3’)	Temperatura	Veličina fragmenta
S0005	5	F-TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCTGATTCTGGGTA	55°C	203 - 267
Sw2410	8	A-ATTTGCCCCCAAGGTATTTC CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	50°C	90 - 131
sw240	2	H-AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA	55°C	92 - 124
S0090	12	F-CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG	55°C	227 - 249
Sw1067	6	A-TGCTGGCCAGTGACTCTG CCGGGGGATTAAACAAAAAG	55°C	136 - 176

Tablica 32. Izračunate FST vrijednosti za 26 mikrosatelitna markera u 8 populacija svinja

Marker	CS	CSX	D	J	L	PIC	P	TP
S0026	0,0737	0,08015	0,05693	0,05439	0,0573	0,05368	0,06169	0,03896
S0155	0,27234	0,24398	0,15344	0,23487	0,21669	0,22575	0,20127	0,18156
S0005	0,13988	0,11506	0,10078	0,10795	0,10278	0,12309	0,11822	0,08419
Sw2410	0,08862	0,08849	0,07717	0,08639	0,07862	0,08515	0,08308	0,06452
Sw632	0,11038	0,10114	0,06997	0,09225	0,07773	0,10614	0,04636	0,09321
Swr1941	0,32738	0,29705	0,28034	0,29104	0,26824	0,32881	0,338	0,30188
Sw241	0,16593	0,18749	0,15838	0,16211	0,15391	0,17596	0,13525	0,10731
Sw830	0,2166	0,22865	0,18684	0,22437	0,20857	0,21987	0,1999	0,17897
S0355	0,19266	0,12671	0,17274	0,18119	0,18243	0,20803	0,17809	0,17017
Sw936	0,12169	0,12812	0,11318	0,09956	0,11419	0,13496	0,13296	0,11042
S0218	0,05914	0,15019	0,10655	0,12679	0,10063	0,12234	0,14162	0,07669
S0228	0,26641	0,32875	0,3083	0,33005	0,32223	0,34358	0,34237	0,24639
sw240	0,10308	0,09227	0,08279	0,07968	0,07891	0,07241	0,0903	0,05499
IGF1	0,05904	0,08484	0,04798	0,05848	0,07156	0,08405	0,07694	0,0549
Sw2406	0,20314	0,16712	0,16289	0,17539	0,16829	0,17505	0,12625	0,11711
Sw122	0,22337	0,18974	0,17924	0,19445	0,17855	0,19114	0,10164	0,15063
Sw857	0,15823	0,14319	0,14225	0,14756	0,14871	0,15708	0,14984	0,08117
S0097	0,07614	0,06196	0,05608	0,0572	0,05989	0,04696	0,05024	0,0325
Sw72	0,21815	0,16982	0,1609	0,12386	0,14734	0,18343	0,11491	0,13998
S0226	0,30903	0,28896	0,1801	0,25272	0,23035	0,26862	0,20116	0,165
SO090	0,19399	0,16836	0,10909	0,15534	0,15002	0,1216	0,14118	0,15492
Sw911	0,17788	0,1692	0,16577	0,18377	0,15501	0,1755	0,14804	0,1698
S0002	0,08827	0,08938	0,07465	0,08294	0,05115	0,07979	0,04312	0,0661
Sw200	0,16315	0,16073	0,14422	0,13635	0,14596	0,10733	0,12702	0,13531
Sw10678	0,23143	0,22964	0,17745	0,20888	0,20148	0,20783	0,17216	0,22256
S0101	0,10919	0,10414	0,05409	0,08426	0,08496	0,08277	0,07557	0,06272
Prosječno	0,167262	0,161351	0,135466	0,151225	0,144442	0,156958	0,138353	0,125460

CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs

Tablica 33. Očekivana MP vrijednost izražena za mikrosatelitske lokuse u ispitivanim populacijama svinja

Marker	CS	CSX	D	J	L	PIC	P	TP
S0026	1,580443E-04	1,562754E-04	1,161008E-04	1,086411E-04	9,822096E-05	1,584483E-04	9,244600E-05	3,460195E-05
S0155	4,420367E-05	4,567298E-05	1,539503E-06	3,251122E-05	8,300467E-06	3,655885E-05	1,746904E-05	4,600610E-06
S0005	4,247444E-16	2,626527E-16	9,692627E-18	4,063819E-17	1,961978E-17	2,185410E-16	3,718396E-17	1,900057E-18
Sw2410	1,812977E-05	1,434973E-05	8,322132E-06	1,272098E-05	1,061907E-05	2,899258E-05	1,010868E-05	6,165004E-06
Sw632	2,760224E-05	1,927411E-05	1,539503E-06	1,682099E-05	1,176798E-05	1,974999E-05	3,031553E-05	5,817586E-06
Swr1941	1,669962E-07	9,264074E-08	3,610018E-08	3,153424E-07	6,231663E-08	1,391836E-07	1,547232E-07	7,922689E-08
Sw241	8,656057E-08	1,689494E-07	2,871998E-08	4,201807E-08	4,071599E-08	1,333778E-07	2,934258E-08	7,144054E-09
Sw830	8,670496E-06	2,939080E-06	1,923476E-07	1,355876E-06	8,974488E-07	1,541126E-06	7,926804E-07	2,634589E-07
S0355	4,389986E-07	2,678487E-07	3,542119E-08	1,992179E-07	1,610722E-07	4,244133E-07	1,759132E-07	5,849356E-08
Sw936	8,635801E-06	6,665899E-06	1,024859E-06	4,492829E-06	3,587764E-06	8,952615E-06	7,760138E-06	4,533470E-06
S0218	8,807142E-03	7,142721E-03	5,785676E-03	5,749342E-03	1,470061E-03	4,823083E-03	6,313299E-03	1,007699E-03
S0228	4,700767E-05	6,428273E-05	4,434167E-05	2,124680E-04	5,423165E-05	1,488813E-04	1,115122E-04	3,589881E-05
sw240	1,786184E-08	3,494874E-08	5,403523E-09	7,898668E-09	7,630153E-09	9,218055E-09	7,651454E-09	6,475075E-10
IGF1	1,883023E-07	1,363102E-07	8,060781E-09	3,392130E-08	4,717760E-08	9,586738E-08	4,019790E-08	5,486565E-09
Sw2406	7,181611E-08	6,655987E-08	2,703636E-08	2,554921E-08	3,167197E-08	3,078716E-08	3,336704E-09	5,833926E-09
Sw122	7,015909E-07	5,391211E-07	5,758922E-08	3,694566E-07	1,286600E-07	4,238060E-07	3,911531E-08	6,294103E-08
Sw857	5,475366E-05	3,341684E-05	1,033042E-05	2,886441E-05	2,769681E-05	3,730553E-05	2,504684E-05	8,051263E-06
S0097	2,321992E-06	4,768377E-06	5,520905E-07	1,321262E-06	1,158564E-06	1,167474E-06	6,540839E-07	8,744840E-07
Sw72	6,720354E-04	6,213833E-04	3,604322E-04	5,510340E-04	3,756565E-04	7,486537E-04	9,455168E-05	1,136097E-04
S0226	1,047090E-06	2,264167E-06	5,422826E-08	9,597498E-07	4,259858E-07	1,616901E-06	2,101152E-07	5,362098E-08
SO090	1,977365E-08	1,585126E-08	3,585034E-10	9,493910E-09	5,536140E-09	6,607353E-09	4,719249E-09	3,639159E-09
Sw911	1,861733E-04	1,722722E-04	4,434167E-05	1,640104E-04	3,620257E-05	2,241965E-04	5,076171E-05	5,483155E-05
S0002	1,310243E-07	8,944537E-08	2,871998E-08	4,946649E-08	1,561068E-08	5,267425E-08	1,930598E-08	1,917569E-08
Sw2008	1,625970E-03	1,522669E-03	1,319323E-03	2,569294E-03	1,122618E-03	3,229509E-03	7,615456E-04	9,341247E-04
Sw1067	5,622311E-08	5,854792E-08	6,775352E-09	6,664170E-08	3,834821E-08	3,566733E-08	1,304820E-08	2,271617E-08
S0101	1,276828E-06	1,351862E-06	5,422826E-08	5,174802E-07	3,531973E-07	1,420302E-06	3,318127E-07	5,700495E-07

CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs

Tablica 34. Mikrosateliti s najnižim vrijednostima MP unutar populacije analiziranih pasmina te unutar populacije crne slavonske pasmine

Marker	CS	CSX		D	J	L	PIC	P	TP
	A	A	B	A	A	A	A	A	A
S0005	4,247444E-16	2,626527E-16	6.381862e-21	9,692627E-18	4,063819E-17	1,961978E-17	2,185410E-16	3,718396E-17	1,900057E-18
Sw241	8,656057E-08	1,689494E-07	7.900206e-12	2,871998E-08	4,201807E-08	4,071599E-08	1,333778E-07	2,934258E-08	7,144054E-09
Sw106	5,622311E-08	5,854792E-08	1.243555e-08	6,775352E-09	6,664170E-08	3,834821E-08	3,566733E-08	1,304820E-08	2,271617E-08
SO090	1,977365E-08	1,585126E-08	3.401111e-17	3,585034E-10	9,493910E-09	5,536140E-09	6,607353E-09	4,719249E-09	3,639159E-09
sw240	1,786184E-08	3,494874E-08	2.179882e-10	5,403523E-09	7,898668E-09	7,630153E-09	9,218055E-09	7,651454E-09	6,475075E-10

CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs
A= MP vrijednost izračunata za mikrosatelitske markere u ispitivanim populacijama svinja;
B= MP vrijednost izražena za mikrosatelitske markere u populaciji crne slavonske pasmine

Tablica 35. Očekivana MP vrijednost izražena za mikrosatelitske markere unutar populacije crne slavonske pasmine

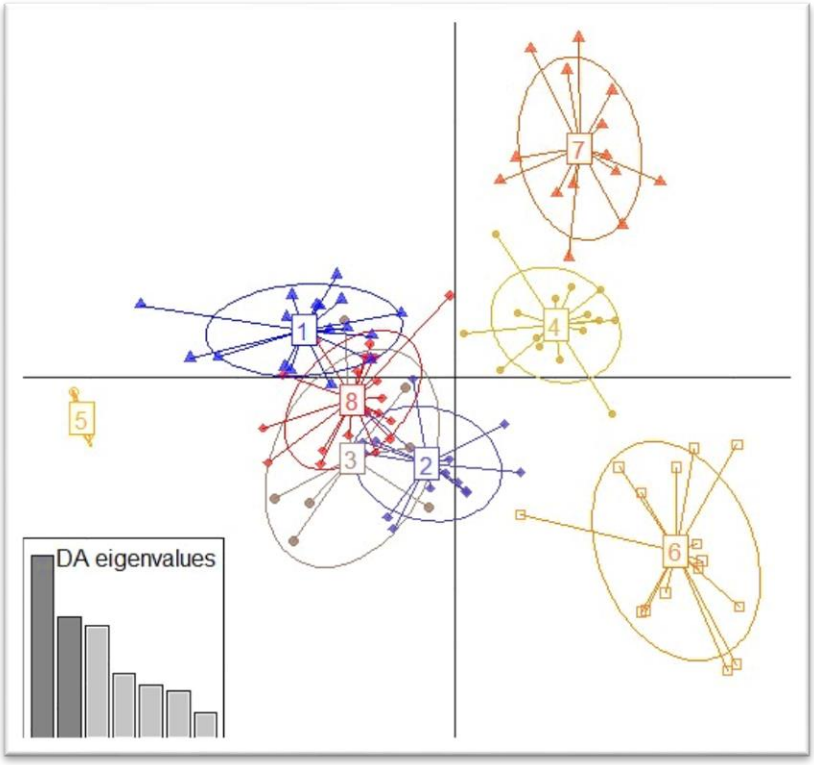
Marker	MP vrijednost	*Marker*	MP vrijednost
S0026	1.999400e-04	*IGF1*	2.865469e-09
S0155	1.279626e-04	*Sw2406*	1.293508e-07
S0005	6.381862e-21	*Sw122*	6.174775e-09
Sw2410	7.277227e-04	*Sw857*	3.332004e-05
Sw632	1.252743e-06	*S0097*	9.859617e-09
Swr1941	4.240408e-06	*Sw72*	2.898437e-03
Sw241	7.900206e-12	*S0226*	3.043210e-07
Sw830	6.452430e-10	*SO090*	3.401111e-17
S0355	3.177122e-09	*Sw911*	4.869031e-04
Sw936	1.999400e-04	*S0002*	1.667465e-09
S0218	2.340219e-01	*Sw2008*	1.132111e-04
S0228	1.301315e-09	*Sw1067*	1.243555e-08
sw240	2.179882e-10	*S0101*	1.126026e-09

MP-vjerojatnost identiteta

Iz tablica 33. i 35. je vidljivo da se izračunate MP vrijednosti za 26 mikrosatelitska markera razlikuju u svakoj populaciji svinja te unutar populacije crne slavonske svinje. Najniže MP vrijednosti su zabilježene na markerima S0005, a iznosile su 1,900057E-18 za topigs svinje (T). Navedeni marker osim najbolje MP vrijednosti ima i zabilježena 2 privatna alela te PIC vrijednosti veću od 0,5 što ga čini dobrim markerom kojim se može provesti autentifikacija proizvoda. Najniže MP vrijednosti su zabilježene na navedenom markeru kod svih ispitivanih pasmina, a kretale su se od 2,626527E-16 kod crne slavonske pasmine koja se heterozigoti po *MC1R* genu do 9,692627E-18 kod duroka. Nadalje, najniže MP vrijednosti su zabilježene na markerima SO005, SW2410, SW240, SW2406, SO090 te SW1067. MP vrijednosti nam govori kolika je vjerojatnost da dvije jedinke dijele zajednički genotip, tj. kolika je vjerojatnost pojave određenih zajedničkih alela kod takvih jedinka. Ukoliko su MP

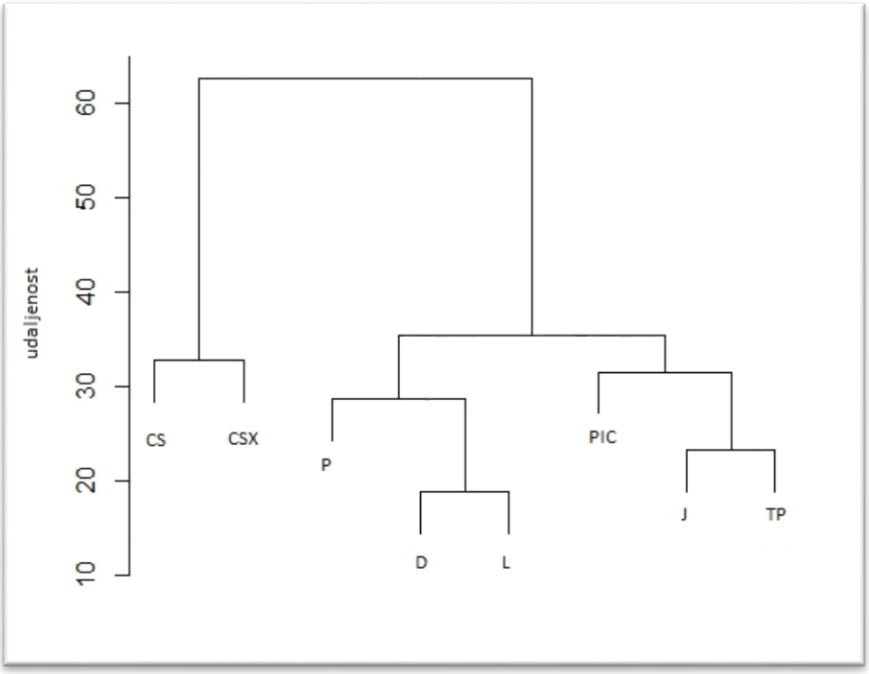
vrijednosti niske značiti će da je vrlo malu vjerojatnost pojave identičnih alela, tj. identičnog genotipa. Ukoliko markeri koji imaju najniže MP vrijednosti mogu identificirati i razdijeliti životinje u odvojene genetske razrede to nam govori da su oni dobar genetski markeri za uspješnu identifikaciju analiziranih pasmina svinja. U tablici 34. su prikazane MP vrijednosti izračunate samo za populaciju crne slavonske svinje. Zabilježene su najniže MP vrijednosti na lokusima S0005, SW241, SW240, SW830 i SO090. S obzirom na to da je lokus SW2406 pokazao veću vrijednost u ovom stupnju analize (1.293508e-07) navedeni marker je isključen iz daljnje analize. Nadalje, markeri SO005, SW241 i SW240 su pokazali niže MP vrijednosti što je potvrdilo njihov odabir.

Temeljem dobivenih podataka odabrano je 5 markera koji su pokazivali najbolje MP vrijednosti istovremeno uzimajući u obzir PIC vrijednosti te broj privatnih alela po lokusu. Izračunate MP vrijednosti su se kretale u vrijednostima od 1,786184E-08 do 4,247444E-16 za svinje crne slavonske pasmine koje su homozigoti prema *MC1R* genu, od 3,494874E-08 do 2,626527E-16 za svinje crne slavonske pasmine koje su heterozigoti prema *MC1R* genu, od 5,403523E-09 do 9,692627E-18 za pasminu durok, od 7,898668E-09 do 4,063819E-17 za pasminu veliki jorkšir, od 7,630153E-09 do 1,961978E-17 za pasminu landras, od 9,218055E-09 do 2,185410E-16 za PIC svinje, od 7,651454E-09 do 3,718396E-17 za pasminu pietrena te od 6,475075E-10 do 1,900057E-18 za topigs svinje (Tablica 34.). Na temelju ovih podataka proizlazi zaključak da će kod skupine crne slavonske pasmine koje su homozigoti prema *MC1R* genu samo 4 životinje na 10 kvadrilijona ($^{-16}$) imati isti genotip, što predstavlja vrlo malu vjerojatnosti istog genotipa između dviju životinja, no istovremeno znači da ukoliko marker može identificirati i smjestiti životinje u određeni genetski klaster, vrlo je mala vjerojatnost da će životinja biti dodijeljena pogrješnom genetskom klasteru. Analiza odabranog set od 5 mikrosatelitna markera je pokazala MP vrijednosti od 1.243555e-08 do 6.381862e-21 kod crne slavonske pasmine što ukazuje na visoku osjetljivost odabranih markera. Weir i Ott (1997.) i Arana i sur. (2002.) definiraju vjerojatnost kao vjerojatnost pronalaska dvije jedinke koje imaju identičan genotip. Dalvit i sur. (2008.) su primjenom smanjenog broja mikrosatelita razvili sustav autentifikacije mesa kod različitih pasmina goveda. Kombinacijom vrijednosti izračunate vjerojatnosti, frekvencije alela te utvrđenog broja privatnih alela smanjili su broj mikrosatelita potrebnih za analizu. Ista metoda smanjivanja broja mikrosatelita bile je primijenjena i u našem istraživanju.



Graf 14. DAPC analiza istraživanih pasmina uz set od 5 mikrosatelitna markera

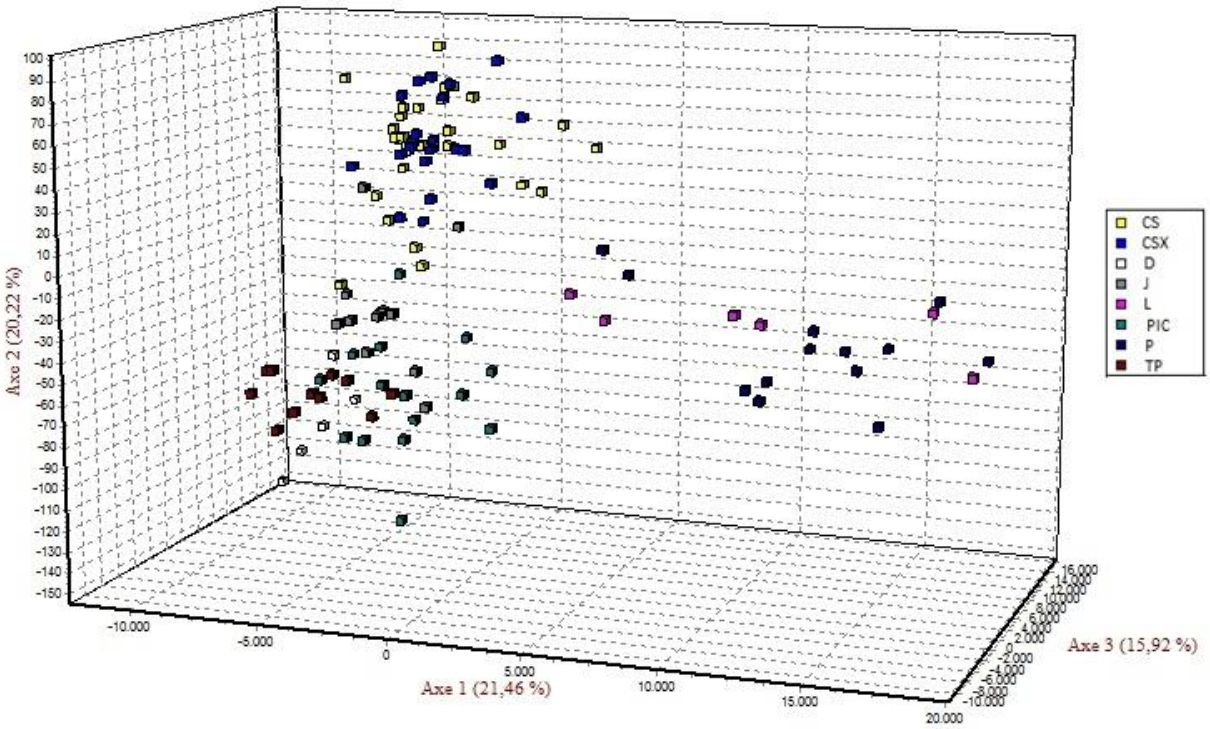
(1- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; 2- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; 3- durok; 4- veliki jorkšir; 5- landras; 6- PIC; 7- pietren; 8- topigs)



Graf 15. UPGMA analiza ispitivanih populacija uz set od 5 mikrosatelitna lokusa

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs)

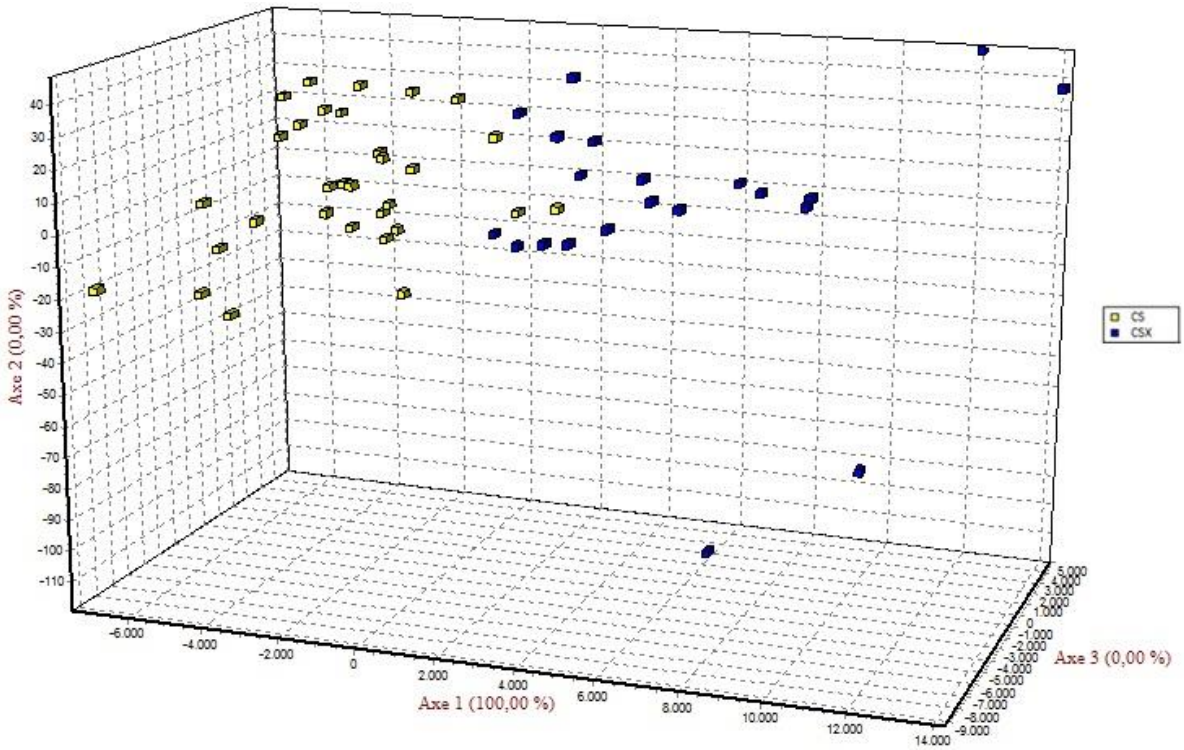
Za razliku od Bayesian analize populacija u programu STRUCTURE, diskriminantna analiza glavnih komponenti (eng. discriminant analysis of principal components, DAPC) je multivarijantna metoda koja se koristi za procjenu broja klastera genetski povezanih jedinki. Varijanca unutar ispitivanog uzorka je podijeljena na dvije komponente; unutar grupe i između grupa, a s ciljem maksimiziranja razlika. Podaci se u prvom koraku analiziraju metodom analize glavnih komponenti (eng. principal components analysis, PCA), a zatim se stvaraju klasteri pomoću diskriminantne analize (eng. discriminant analysis, DA). Graf 14. prikazuje analizu odnosa istraživanih populacija DAPC analizom. Dobiveni rezultati ukazuju na razdvajanje analiziranih pasmina svinja na 8 klastera što je sukladno dobivenim rezultatima FCA analize. Nadalje, jasno Je razdvajanje populacije crne slavonske pasmine na dva odvojena genetska klastera.



Graf 16. Faktorijalna analiza korespondencije za 8 ispitivanih pasmina uz set od 5 mikrosatelitna markera

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu; D- durok; J- veliki jorkšir; L- landras; PIC- PIC; P- pietren; TP- topigs)

Grafom 17. prikazana je faktorijalna analiza korespondencije provedena uz set od 5 mikrosatelitna markera na uzorku od 107 svinja. Jasno se uočava razdvajanje dviju skupina crne slavonske pasmine od ostalih pasmina svinja uključenih u istraživanje. Grafom 18. je prikazana faktorijalna analiza korespondencije provedena na 50 svinja koje su pripadale skupini crne slavonske pasmine. Grafom se može uočiti razdvajanje svinja koje su pripadnici homozigota po *MC1R* genu od svinja koje su heterozigoti. Ovaj korak analize je potvrdio ranije dobivene rezultate kojima se zaključilo da je set od 5 odabranih mikrosatelitnih markera učinkovit ne samo za razdvajanje crne slavonske pasmine od ostalih pasmina svinja, već da je identifikacija i razdvajanje životinja moguće i unutar iste populacije, no u ovisnosti o pripadnosti jednom od dva moguća genotipa po *MC1R* genu. Nadalje, napravljena je klaster analiza temeljem 5 mikrosatelitna markera te vizualizirana UPGMA dijagramom (Graf 15.). Iz rezultata se može jasno uočiti razdvajanje 7 pasmina svinja u odvojene genetske klastere, te razdvajanje crne slavonske pasmine u dvije skupine.



Graf 17. Faktorijalna analiza korespondencije za dvije skupine crne slavonske pasmine svinja uz set od 5 mikrosatelitna markera

(CS- crna slavonska svinja, homozigoti prema *MC1R* genu; CSX- crna slavonska svinja, heterozigoti prema *MC1R* genu)

Optimizacija broja mikrosatelitskih markera s 26 na 5 markera koji se koriste pri analizi može poslužiti kao dobar alat za identifikaciju pasmine. Uz set od 5 mikrosatelitna markera je moguće identificirati pasminu od koje su proizvedeni pojedini prehrambeni proizvodi, npr. šunka ili pršut, dok identifikacija u kobasičarskim proizvodima nije moguća zbog toga što se takvi proizvodi proizvode od velikog broja životinja što za ovaj tip analize nije pogodno. Tijekom zadnjih godina mikrosatelitski markeri su se pokazali učinkovitima u autentifikaciji proizvoda dobivenih od svinjskog mesa no uz ograničenja u broju životinja od kojih je proizvod dobiven. Shackell i sur. (2005.) navode da je ograničavajući broj životinja u uzorku o kojima ovisi uspješnost analize 10 životinja. Njihovo istraživanje je bilo provedeno na mješavinama od svježeg goveđeg mesa koji su se sastojali od različitog broja životinja. U slučaju da je mješavina pripremljena od više od 10 životinja rezultati analize nisi bili dovoljno precizni, dok su se mikrosatelitski markeri u mješavinama s manje od 10 životinja pokazali kao uspješan markerski sustav za autentifikaciju pasmine. Autentifikacija životinja pomoću mikrosatelita grupiranih u združenim reakcijama omogućuje brže, učinkovitije i jeftinije analiziranje velikog broja alela s ciljem uspješnije autentifikacije analiziranih pasmina svinja. Kim i sur. (2013.) su istražili uspješnost korištenja mikrosatelita u združenim reakcijama pri autentifikaciji i individualnoj identifikacija nekoliko različitih pasmina svinja (korejska svinja, durok, veliki jorkši, landras i berkšir). Kriterij za odabir mikrosatelita bio je istovjetan našoj metodi koja se temeljila na frekvenciji alela te razini polimorfnosti pojedinog markera.

4.3.4. Autentifikacija proizvoda pomoću MC1R gena

Analiza je provedena pomoću jednostavne PCR-RFLP metode temeljene na analizi *MC1R* gena koji je odgovoran za različite genotipove crne boje kod različitih pasmina svinja (Margeta, 2012.). Analizom su identificirana tri polimorfna mjesta specifična za crnu slavonsku svinju, a koja se nalaze između 88 i 428 nukleotidnog mjesta. Restrikcijska endonukleaza Nsp*I* prepoznaje polimorfno mjesto na nukleotidnoj poziciji 128 (ACATGC). Navedenom metodom analize pomoću *MC1R* gena moguće je razlikovati homozigotne svinje prema *MC1R* genu od heterozigota prema *MC1R* genu. Obzirom na to da je na ovaj način moguće provesti identifikaciju svake životinje unutar populacije svinja, autentifikacija proizvoda je moguća samo u pojedinačnim proizvodima dok u kobasičarskim proizvodima to nije slučaj.

```
Hemšir(E^D2)                GGCCGCCATCGCCAAGAACCGCAACCTGCACTCGCCCATGTACTACTTCGTCTGCTGCCT 248
Veliki jorkšir(E^P)         GGCCGCCATCGCCAAGAACCGCAACCTGCACTCGCCCATGTACTACTTCGTCTGCTGCCT 248
Divlja svinja (E^+)         GGCCGCCATCGCCAAGAACCGCAACCTGCACTCGCCCATGTACTACTTCGTCTGCTGCCT 248
Durok (e)                   GGCCGCCATCGCCAAGAACCGCAACCTGCACTCGCCCATGTACTACTTCGTCTGCTGCCT 248
Crna slavonska svinja(E^D1) GGCCGCCATCGCCAAGAACCGCAACCTGCACTCGCCCATGTACTACTTCGTCTGCTGCCT 248
                            ************************************************************

Hemšir (E^D2)               GGCCGTGTCGGACCTGCTGGTGAGCGTGAGCAACGTGCTGGAGACGGCCGTGCTGCTGCT 308
Veliki jorkšir (E^P)        GGCCGTGTCGGACCTGCTGGTGAGCGTGAGCAACGTGCTGGAGACGGCCGTGCTGCTGCT 308
Divlja svinja (E^+)         GGCCGTGTCGGACCTGCTGGTGAGCGTGAGCAACGTGCTGGAGACGGCCGTGCTGCTGCT 308
Durok (e)                   GGCCGTGTCGGACCTGCTGGTGAGCGTGAGCAACGTGCTGGAGACGGCCGTGCTGCTGCT 308
Crna slavonska svinja (E^D1) GGCCGTGTCGGACCTGCTGGTGAGCGTGAGCAACATGCTGGAGACGGCCGTGCTGCCGCT 308
                            ********************************** ********************* ***

Hemšir (E^D2)               GCTGGAGGCGGGCGCCCTGGCCGCCCAGGCCGCCGTGGTGCAGCAGCTGGACAATGTCAT 368
Veliki jorkšir (E^P)        GCTGGAGGCGGGCGCCCTGGCCGCCCAGGCCGCCGTGGTGCAGCAGCTGGACAATGTCAT 368
Divlja svinja (E^+)         GCTGGAGGCGGGCGCCCTGGCCGCCCAGGCCGCCGTGGTGCAGCAGCTGGACAATGTCAT 368
Durok (e)                   GCTGGAGGCGGGCGCCCTGGCCGCCCAGGCCGCCGTGGTGCAGCAGCTGGACAATGTCAT 368
Crna slavonska svinja (E^D1) GCTGGAGGCGGGCGCCCTGGCCGCCCAGGCCGCCGTGGTGCAGCAGCTGGACAACGTCAT 368
                            ******************************************************* ******

Hemšir (E^D2)               GAACGTGCTCATCTGCGGCTCCATGGTGTCCAGCCTCTGCTTCCTGGGCGCCATCGCCGT 428
Veliki jorkšir (E^P)        GAACGTGCTCATCTGCGGCTCCATGGTGTCCAGCCTCTGCTTCCTGGGCGCCATCGCCGT 428
Divlja svinja (E^+)         GGACGTGCTCATCTGCGGCTCCATGGTGTCCAGCCTCTGCTTCCTGGGCGCCATCGCCGT 428
Durok (e)                   GGACGTGCTCATCTGCGGCTCCATGGTGTCCAGCCTCTGCTTCCTGGGCGCCATCGCCGT 428
Crna slavonska svinja (E^D1) GGACGTGCTCATCTGCGGCTCCATGGTGTCCAGCCTCTGCTTCCTGGGCGCCATCGCCGT 428
                            * ********************************************************
```

Slika 44. Sekvenca *MC1R* gena eksona 1 kod pasmina svinja s različitim Extension genotipom. Obojano mjesto predstavlja polimorfno mjesto specifično za crnu slavonsku svinju koje raspoznaje *NspI* restrikcijska endonukleaza

Rezultati analize su ukazali da je od ukupnog broja analiziranih uzoraka crne slavonske pasmine svinje njih 37 % homozigotno po *MC1R* genu dok je za 63 % svinja utvrđeno da pripadaju heterozigotima. Dobiveni rezultati su sukladni rezultatima istraživanja Margete (2012.) koji je utvrdio da je od ukupnog broja analiziranih uzoraka crne slavonske svinje njih 33 % homozigotno, dok je preostalih 67 % svinja pripadalo skupini heterozigota prema *MC1R* genu. Nadalje, autor je zaključio da je primjena jednostavne RFLP-PCR metode učinkovita metoda identifikacije crne slavonske svinje s obzirom na *MC1R* gen za boju dlake. Fernández i sur. (2004.) su na temelju rezultata svog istraživanja zaključili da je analizom *MC1R* gena moguće provesti postupak autentifikacije i identifikacije pasmine od koje su dobiveni prehrambeni proizvodi. Istraživanje je provedeno na iberijskoj pasmini svinja, na svježim uzorcima mesa te u mesnim prerađevinama. Analizu *MC1R* s ciljem identifikacije pasmine proveo je Fontanesi i sur. (2014.). Analiza je provedena na uzorcima svježeg mesa divlje svinje te komercijalnih pasmina svinja koje se uzgajaju u Italiji. Rezultati istraživanja su ukazani na to da je analizom *MC1R* gena moguće identificirati meso dobiveno od divljih svinja te od komercijalnih pasmina, no autor navodi da je analiza daje pouzdanije rezultate ukoliko se M*C1R* gen kombinira s analizom i drugih specifičnih markera, u njihovom slučaju s genom koji određuje broj kralježaka, *NR6A1*. Istraživanje je sukladno našim pretpostavkama

koje uz analizu gena za boju dlake, što je prvi korak postupka identifikacije, uključuje i analizu mikrosatelita kombiniranih u združenoj PCR reakciji, čime bi se povećala točnost rezultata provedene analize. Autentifikaciju pasmine činta sense prema *KIT* genu za boju dlake proveo je Fontanesi i sur. (2016.). Činta sense pasmina je karakteristična po bijelom pojasu koji je posljedica genetske ekspresije *KIT* gena što je u istraživanju uzeto kao glavni parametar za autentifikaciju pasmine. S obzirom na to da hempšir ima vrlo sličan fenotip, no uzimajući u obzir da navedena pasmina uzgojem nije zastupljena u Italiji, autori su odbacili mogućnost pojave njegovog genotipa u analizi što bi dovelo do pogrešaka u rezultatima analize te konačnom donošenju zaključaka. Ista teza je postavljena i prilikom analize crne slavonske svinje prema *MC1R* genu i činjenici da je ova pasmina jedina pasmina crne boje dlake koja se uzgaja na području Republike Hrvatske.

Optimizacija broja mikrosatelitnih lokusa, tj. njihovo smanjivanje omogućiti će bržu i jednostavniju analizu te mogućnost autentifikacije proizvoda od crne slavonske svinje. Odabrani set mikrosatelita dovoljno je informativan te ujedno može razdvojiti homozigote po *MC1R* genu od heterozigota. Kombinacijom analiza optimiziranog broja mikrosatelita te *MC1R* gena može se sa velikom sigurnošću utvrditi pripadanje crnih svinja jednom od genetskih klastera. Nadalje, proizvođači i potrošači će biti zaštićeni od mogućih prijevara na tržištu gotovih proizvoda. Kao zaključak provedene analize proizlazi set od pet mikrosatelitna markera koji mogu poslužiti kao markerski sustav za autentifikaciju pasmine crne slavonske svinje.

5. ZAKLJUČCI

Analiza genetske strukture pasmine

Grupiranjem mikrosatelita u združene PCR reakcije prilikom izvođenja postupka genetske analize znatno se skraćuje njihovo vrijeme provođenja i troškove. Mikrosatelitski markeri su grupirani u jednu reakciju te je istovremeno moguće analizirati više mikrosatelita pri jednoj analizi nego što bi to bilo slučaj kod analize svakog mikro satelitskog markera odvojeno. Nadalje, mikrosateliti su se pokazali kao pouzdani genetski markeri kojima je moguće analizirati genetsku strukturu populacije.

Statističkom obradom podataka izračunata je genetska udaljenost prema Nei (1987.) između crne slavonske svinje koji su homozigoti prema *MC1R* genu i heterozigota prema *MC1R* genu te je iznosila 0,063 što govori da je genetska udaljenost između dviju skupine crne slavonske svinje mala. Najviša genetska udaljenost prema Nei (1987.) izračunata je između pripadnika crne slavonske svinje koji su homozigoti prema *MC1R* genu i topigs svinja, dok su heterozigoti prema *MC1R* genu pokazali najveću genetsku udaljenost s durok pasminom. Filogenetska analiza prikazana neukorijenjenim filogenetskim stablom konstruiranim na osnovi dobivene matrice udaljenosti pomoću neighbour-joining (NJ) metode (Saitou i Nei, 1987.) te UPGMA dijagram izrađen metodom po Sokal i Michener-u (1958.) ukazali su na razdvajanje analiziranih populacija što je u skladu s postavljenom hipotezom. DAPC analiza analiziranih pasmina svinja uz set od 5 mikrosatelitna markera ukazala je na razdvajanje populacija u osam genetskih klastera što upućuje na to da je optimiziran broj mikrosatelita dobar alat za identifikaciju crne slavonske pasmine svinja.

Analiza frekvencije alela ukazala je na postojanje 16 privatnih alela specifičnih za crne slavonske svinje koji su homozigoti prema *MC1R* genu, 10 alela specifičnih za heterozigote prema *MC1R* genu te 17 zajedničkih privatnih alela koji se mogu pronaći kod heterozigota i homozigota crne slavonske prema *MC1R* genu. Prosječan broj alela po lokusu je zabilježen kod crne slavonske svinje koji su homozigoti prema *MC1R* genu bio je 6,538, dok je najmanji broj alela zabilježen kod durok pasmine. Statistička značajnost koeficijenta inbridinga je uočena za markere SO218, SO090, SW240 i SOOO2. Prosječan broj alela kod heterozigota prema *MC1R* genu crne slavonske svinje iznosio je 5,961 dok je statistička značajnost koeficijenta inbridinga je uočena za markere SW240, SO090, SW1067, IGF1 i SW911. Utvrđen je prosječan broj alela kod jorkšir pasmine koji je iznosio 4,5 dok je statistička

značajnost koeficijenta inbridinga je uočena za markere SO218, SO090, SW240. Kod landras pasmine je prosječan broj alela iznosio je 3,3461, a statistička značajnost koeficijenta inbridinga je uočena za markere SO228 i sw1067. Prosječan broj alela kod pietrain pasmine iznosio je 4,1538 dok je statistička značajnost koeficijenta inbridinga je uočena za markere SO218 i SW1067. Prosječan broj alela kod topigs pasmine iznosio je 3,3461, a statistička značajnost koeficijenta inbridinga je uočena za markere SW830, SW122 i SOO97. Dobiveni rezultati su u skladu s postavljenom hipotezom da unutar populacije crne slavonske svinje postoji određeni stupanj inbridinga i heterozigotnost lokusa.

Faktorijalna analiza korespondencije svih ispitanih pasmina uz set od 26 mikrosatelitska markera ukazala je na 23,35 varijabilnosti na osi x, 19,09 % varijabilnosti na osi y te 18,02 % varijabilnosti na osi z što je jasno uputilo na diferencijaciju analiziranih pasmina na osam genetskih klastera. Faktorijalnom analizom korespondencije dviju skupina crne slavonske pasmine uz set od 26 mikrosatelitska markera jasno se uočava diferencijacija na dva genetska klastera od kojih jedan čine heterozigoti prema *MC1R* genu, dok drugi genetski klaster čine svinje za koje je prethodnim testom utvrđeno da se homozigoti po *MC1R* genu. Analizom polimorfizma *MC1R* gena utvrđena je prisutnost homozigota i heterozigota prema *MC1R* genu što je u skladu s postavljenom hipotezom da je metoda analize pomoću polimorfizma jednog nukleotida (SNP) u *MC1R* genu učinkovita metoda identifikacije homozigotnih i heterozigotnih svinja prema *MC1R* genu.

Autentifikacija proizvoda crne slavonske pasmine

Početna analiza genetske strukture se temeljila na analizi uz set od 26 mikrosatelitska markera koji su bili podijeljeni u tri združene PCR reakcije od po 9 mikrosatelita u svakoj. Iako je provođenje ovog tipa analize brže i jeftinije u odnosu na analizu svakog mikrosatelitnog markera pojedinačno, pristupilo se smanjivanju, tj. optimizaciji broja mikrosatelitskih markera na najmanji mogući broj dovoljan za identifikaciju te autentifikaciju proizvoda. Optimizacija mikrosatelita se u prvom koraku odnosila na isključivanje onih koji nemaju dovoljnu razinu polimorfnosti te zastupljenost privatnih alela. Prva faza uključivala je smanjivanje na 9 mikrosatelitska markera gdje je STRUCTURE analizom jasno vidljivo grupirane pasmina svinja u 8 genetskih klastera što je ujedno potvrđeno određivanjem broja genetskih klastera K temeljem Evanno metode (2005.). Nadalje, faktorijalnom analizom korespondencije za ispitivane pasmine svinja uz set od 9 mikrosatelitska markera jasno je uočeno razdvajanje dvije skupina crne slavonske pasmine svinja od ostalih ispitivanih

pasmina. Ukupna varijabilnost na prvoj osi iznosila je 24,40 %, na drugoj osi bila je 20,32 % dok je na trećoj osi njezina vrijednost iznosila 16,94 %.

U sljedećem koraku iz analize je isključen markera SW1941 zbog nepostojanja privatnih alela za crnu slavonsku pasminu svinja na njemu. Rezultati dobiveni statističkom obradom u STRUCUTRE programskom paketu su ukazali na to da razdvajanje pasmina nije učinkovito kao što je to u slučaju analize uz set od 9 mikrosatelitskih markera. Nadalje, faktorijalnom analizom korespondencije utvrđena je ukupna varijabilnost na prvoj osi koja je iznosila 24,07%, na drugoj osi 21,05% te na trećoj osi 17,27%. Položaj pasmine crne slavonske svinje u odnosu na ostale ispitivane pasmine nije jasno određen, tj. ne postoji jasna granica genetskih klastera ispitivanih pasmina svinja.

U zadnjem koraku optimizacije broja mikrosatelita pristupilo se smanjivanju broja mikrosatelitskih lokusa dovoljnih za identifikaciju i autentifikaciju temeljem broja privatnih alela, informacijskog sadržaj polimorfizma te izračunom vjerojatnosti identiteta. Prvi korak odnosio se na izračun MP vrijednosti za mikrosatelitske markere kod svih istraživanih pasmina svinja. Najniže MP vrijednosti su zabilježene na SO005 lokusu kod svih ispitivanih pasmina, a kretale su se od 2,626527E-16 kod crne slavonske pasmine koja se heterozigoti po *MC1R* genu do 9,692627E-18 kod duroka. Najniže MP vrijednosti su zabilježene na markerima SO005, SW2410, SW240, SW2406, SO090 te SW1067. U sljedećem koraku se pristupilo izračunu MP vrijednosti kod pasmine crne slavonske pasmine s time da je cijela populacija promatrana kao jedan genetski klaster. S obzirom na to pristupilo se i izračunu novih frekvencija gena u navedenoj populaciji. Rezultati analize su ukazali da su najniže MP vrijednosti na markerima S0005, SW2410, SW240, SW830 i SO090. Usporedbom markera s najnižim MP vrijednostima odabran je set od 5 mikrosatelitna markera za daljnju analizu. MP vrijednosti su se kretale u vrijednostima od 1,786184E-08 do 4,247444E-16 za svinje crne slavonske pasmine koje su homozigoti prema *MC1R* genu, od 3,494874E-08 do 2,626527E-16 za svinje crne slavonske pasmine koje su heterozigoti prema *MC1R* genu, od 5,403523E-09 do 9,692627E-18 za pasminu durok, od 7,898668E-09 do 4,063819E-17 za pasminu veliki jorkšir, od 7,630153E-09 do 1,961978E-17 za pasminu landras, od 9,218055E-09 do 2,185410E-16 za PIC svinje, od 7,651454E-09 do 3,718396E-17 za pasminu pietrena te od 6,475075E-10 do 1,900057E-18 za topigs svinje. Analiza odabranog set od 5 mikrosatelitna markera je pokazala MP vrijednosti od 1,243555e-08 do 6,381862e-21 kod crne slavonske pasmine. Odabrani set pokazuje visoku osjetljivost te mogućnost detekcije i identifikacije životinja koje pripadaju pasmini crne slavonske svinje.

Faktorijalnom analizom korespondencije se jasno uočava razdvajanje crne slavonske pasmine svinja u odvojen genetski klaster no ujedno se uočava i razdvajanje dvije skupine crnih slavonskih svinja koje su heterozigoti i homozigoti po *MC1R* genu na dva odvojena genetska klastera. DAPC analiza te klaster analiza vizualizirana UPGMA dijagramom je potvrdila rezultate faktorijalne analize. Iz dobivenih rezultata proizlazi zaključak da je set od 5 mikrosatelitskih markera dovoljan za identifikaciju i autentifikaciju proizvoda od crne slavonske svinje te ujedno omogućava interpasminsku i intrapasminsku identifikaciju. Dizajniranjem seta optimalnog broja mikrosatelitskih markera moguća je identifikacija pasmine i autentifikacija proizvoda od crne slavonske svinje, a kombiniranom analizom uz *MC1R* gen može se sa velikom sigurnošću utvrditi pripadanje crnih svinja jednom od genetskih klastera. Autentifikacija proizvoda uz set od 5 mikrosatelitska markera može identificirati pasminu od koje su proizvedeni pojedini prehrambeni proizvodi dok identifikacija u kobasičarskim proizvodima nije moguća zbog toga što se takvi proizvodi proizvode od većeg broja životinja što za ovaj tip analize nije pogodno.

6. LITERATURA

1. Abdulmawjood, A., Krischek, C., Wicke, M., Klein, G. (2012.): Determination of pig sex in meat and meat products using multiplex real time-PCR. Meat science, 91(3): 272-276.
2. Ai, H., Luang L., Ren J. (2013.): "Genetic diversity, linkage disequilibrium and selection signatures in Chinese and Western pigs revealed by genome-wide SNP markers. PloS one, 8 (2): e56001.
3. Alexandratos, N., Bruinsma, J. (2012.): World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision (No. 12-03, p. 4). Rome, FAO: ESA Working paper.
4. Ali, M. E., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y. B. C. (2012.): Swine-specific PCR-RFLP assay targeting mitochondrial cytochrome B gene for semiquantitative detection of pork in commercial meat products. Food Analytical Methods, 5(3): 613-623.
5. Ali, M. E., Kashif, M., Uddin, K., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y. B. C. (2012.a): Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics. Food Analytical Methods, 5(5): 935-955.
6. Ali, M. A., Gyulai, G., Hidvegi, N., Kerti, B., Al Hemaid, F. M., Pandey, A. K., Lee, J. (2014.): The changing epitome of species identification–DNA barcoding. Saudi journal of biological sciences, 21(3): 204-231.
7. Ali, M. E., Razzak, M. A., Hamid, S. B. A., Rahman, M. M., Al Amin, M., Rashid, N. R. A. (2015.): Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. Food chemistry, 177: 214-224.
8. Alves, E., Castellanos, C., Ovilo, C., Silio, L., Rodrıguez, C. (2002.): Differentiation of the raw material of the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. Meat Science, 61(2): 157-162.
9. Alves, E, Fernández, A. I., García-Cortés, L. A., Lopez, A. (2012.): Is it possible the breed origin traceability of Iberian pigs? In: 7th International Symposium on the Mediterranean Pig (De Pedro EJ and Cabezas AB, eds.). CIHEAM Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens, n. 101, Zaragoza, 565-571.
10. Arana, A., Soret, B., Lasa, I., Alfonso, L. (2002.): Meat traceability using DNA markers: application to the beef industry. Meat Science, 61(4), 367-373.
11. Archibald, A. L., Haley, C. S., Brown, J. F., Couperwhite, S., McQueen, H., Nicholson, D., Coppieters, W., Van de Weghe, A., Stratil, A., Wintero, A.K.,

Fredholm, M., Larsen, N. J., Nielsen, V. H., Milan, D., Woloszyn, N., Robic, A., Dalens, M., Riquet, J., Gellin, J., Caritez, J.C., Burgaud, G., Ollivier, L., Bidanel, J. P., Vaiman, M., Renard, C., Geldermann, H., Davoli, R., Ruyter, D., Verstege, J. M., Groenen, M. A. M., Davies, W., Hoyheim, B., Keiserud, A., Andersson, L., Ellegren, H., Johansson, M., Marklund, L., Miller, J. R., Anderson Dear, D. V., Signer, E., Jeffreys, A. J., Moran, C., Le Tissier, Muladno, P. R., Rothschild, M. F., Tuggle, C. K., Vaske, D., Helm, J., Liu, H.C., Rahman, A., Yu, T.P., Larson, R. G., Schmitz, C. B. (1995.): The PiGMaP consortium linkage map of the pig (Sus scrofa). Mammalian Genome, 6: 157-175.

12. Ayaz, Y., Ayaz, N. D., Erol, I. (2006.): Detection of species in meat and meat products using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Journal of Muscle Foods, 17(2): 214-220.
13. Ayizanga, R.A., Kayang, B.B., Adomako, K., Adenyo, C., Inoue-Murayama, M. and Asamoah, L. (2016.): Genetic diversity of some Ghanaian pigs based on microsatellite markers. Livestock Research for Rural Development, 28 (2): 1-12.
14. Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, F. Catch. (2004.): "Genetix 4.05. 2." University of Montpellier II, Laboratoire Génome et Populations, Montpellier, France.
15. Ballin, N. Z. (2010.): Authentication of meat and meat products. Meat Science, 86 (3): 577-587.
16. Barakat, H., El-Garhy, H. A., Moustafa, M. M. (2014.): Detection of pork adulteration in processed meat by species-specific PCR-QIAxcel procedure based on D-loop and cytb genes. Applied microbiology and biotechnology, 98(23): 9805-9816.
17. Barcaccia, G., Lucchin, M., Cassandro, M. (2015.): DNA Barcoding as a Molecular Tool to Track Down Mislabeling and Food Piracy. Diversity, 8(1): 2.
18. Barreiro, R., Regal, P., Díaz-Bao, M., Fente, C. A., Cepeda, A. (2015.): Analysis of Naturally Occurring Steroid Hormones in Infant Formulas by HPLC-MS/MS and Contribution to Dietary Intake. Foods, 4(4): 605-621.
19. Barker J.S.F. (1994): A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proc. 5th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod., Guelph, Canada 21:501–508.
20. Bourgon, R., Lu, S., Yan, Y., Lackner, M. R., Wang, W., Weigman, V., Patel, R. (2014.): High-throughput detection of clinically relevant mutations in archived tumor samples by multiplexed PCR and next-generation sequencing. Clinical Cancer Research, 20(8): 2080-2091.

21. Bradić, M., Uremović, M., Uremović, Z., Mioč, B., Konjačić, M., Luković, Z., Safner, T. (2007.): Mikrosatelitna analiza genetske raznolikosti Crne slavonske svinje. Acta veterinaria, 57(2-3): 209-215.
22. Butko, D., Senčić, Đ., Antunović, Z., Šperanda, M., & Steiner, Z. (2007.): Pork carcass composition and the meat quality of the Black Slavonian pig–the endangered breeds in the indoor and outdoor keeping system. Poljoprivreda, 13(1): 167-171.
23. Caput, P., Ivanković, A. and Konjačić, M. (2004.): Genome typing of autochthonous breeds of domestic animals in Croatia. In FAO-DAGENE Meeting-" Molecular Genetic Methods and Research on the Biodiversity of Autochthonous Domestic Animal breeds".
24. Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Rainer, J. E., Nguyen, P. N., Thomas, C. (1988.): Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic acids research, 16(23): 11141-11156.
25. Chen, C-H., Huang, H-L.,Yang, H-Y., Lai, S-H.,Yen, N-T., Wu, M-C., Huang, M-C. (2011.): Mitochondrial genome of Taiwan pig (*Sus Scrofa*). African Journal of Biotechnology, 10(13): 2556-2561.
26. Cheng, X., He, W., Huang, F., Huang, M., Zhou, G. (2014.): Multiplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from duck, pig and chicken in Chinese blood curds. Food Research International, 60: 30-37.
27. Chisholm, J., Conyers, C. M., Hird, H. (2008.): Species identification in food products using the bioMerieux FoodExpert-ID® system. European Food Research and Technology, 228(1): 39-45.
28. Colombo, F., Chess, S., Cattaneo, P., Bernardi, C. (2011.): Polymerase chain reaction products (PCR) on “DNA barcode zone” resolved by temporal temperature gradient electophoresis: A tool for species identification of mixed meat specimens—A technical note on preliminary results. Food Control, 22: 1471–1472.
29. COUNCIL REGULATION (EC) No 510/2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs.
30. Cooper, G., Hausman, R. (2004.): The Cell: A Molecular Approach. 3rd. Washington, D.C.: The American Society for Microbiology Press, 2004.
31. Corrado, G. (2016.): Advances in DNA typing in the agro-food supply chain.Trends in Food Science & Technology, 52: 80-89.
32. Cortés, O., Martinez, A.M., Cañon, J., Sevane, N., Gama, L.T., Ginja, C., Landi, V., Zaragoza, P., Carolino, N., Vicente, A. and Sponenberg, P. (2016.): Conservation

priorities of Iberoamerican pig breeds and their ancestors based on microsatellite information. Heredity.

33. Crooijmans, R.P.M.A., San Cristobal, M., Hui, X., Li, N., Groenen, M.A.M. (2008): Biodiversity of pig breeds from China and Europe estimated from pooled DNA samples: differences in microsatellite variation between two areas of domestication. Genet. Sel. Evol. 40, 103–128.
34. Dai, Z., Qiao, J., Yang, S., Hu, S., Zuo, J., Zhu, W., Huang, C. (2015.): Species Authentication of Common Meat Based on PCR Analysis of the Mitochondrial COI Gene. Applied biochemistry and biotechnology, 176(6): 1770-1780.
35. Dalvit, C., De Marchi, M., Targhetta, C., Gervaso, M., Cassandro, M. (2008.): Genetic traceability of meat using microsatellite markers. Food Research International, 41(3): 301-307.
36. Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., Bottero, M.T. (2004.): A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Molecular and Cellular Probes, 18: 81–87.
37. Dent A. E., vonHoldt, B.M. (2012.): STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
38. Dong, L., Maoliang, R., Li, Z., Chen, B. (2016.): The complete mitochondrial genome sequence of Meishan pig (Sus Scrofa) and a phylogenetic study. Mitochondrial DNA Part B, 1-2.
39. Doosti, A., Dehkordi, P. G., Rahimi, E. (2014.): Molecular assay to fraud identification of meat products. Journal of food science and technology, 51(1): 148-152.
40. Druml, T., Salajpal, K., Dikic, M., Urosevic, M., Grilz-Seger, G., Baumung, R. (2012.):. Genetic diversity, population structure and subdivision of local Balkan pig breeds in Austria, Croatia, Serbia and Bosnia-Herzegovina and its practical value in conservation programs. Genetics Selection Evolution, 44(1): 5.
41. Duran C., Appleby N., Edwards D., Batley J. (2009.): Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. Current Bioinformatics. 4(1): 16-27.
42. Đikić, M., Šprem, N., Salajpal, K., Jurić, J., Đikić, D., Safner, T., Čurik, V. Č. (2012.): Microsatellite characterisation of Croatian autochthonous pig breeds. In Croatian

Symposium on Agriculture (47; 2012); International Symposium on Agriculture (7; 2012).

43. Fan, B., Wang, Z.G., Li, Y.J., Zhao, X.L., Liu, B., Zhao, S.H., Yu, M., Li, M., Xiong, T., Li, K. (2002.): Genetic variation analysis within and among Chinese indigenous swine populations using microsatellite markers. Animal Genetics, 33:422–427.
44. „Fajferica“ udruga uzgajivača Crne slavonske svinje Slavonije, Baranje i zapadnog Srijema. Pravilnik o radu UCSS „Fajferica“ (2014.)
45. Fang, M., Larson, G., Ribeiro, H. S., Li, N., Andersson, L. (2009.): Contrasting mode of evolution at a coat color locus in wild and domestic pigs. PLoS Genet, 5(1): e1000341.
46. FAO (2011.): Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 9. Rome.
47. Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T., Martín, R. (2010.): A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. Trends in Food Science & Technology, 21(8): 408-421.
48. Farrag, S. A., Tanatarov, A. B., Sottan, M. E. (2010.): Using of DNA fingerprinting in poultry Research. International Journal of poultry science, 9(5): 406-416.
49. Farag, M. R., Alagawany, M., Abd El-Hack, M., Tiwari, R., Dhama, K. (2015.): Identification of different animal species in meat and meat products: trends and advances. Journal of Animal and Veterinary Advances, 3(6): 334-346.
50. Fernández, A., Fabuel, E., Alves, E., Rodriguez, C., Silió, L., Óvilo, C. (2004.): DNA tests based on coat colour genes for authentication of the raw material of meat products from Iberian pigs. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(14): 1855-1860.
51. Fernández, A., Fabuel, E., Alves, E., Rodriguez, C., Silió, L., Óvilo, C. (2004): DNA tests based on coat colour genes for authentication of the raw material of meat products from Iberian pigs. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(14): 1855-1860.
52. Fernández, A.I., Fontanesi, L., Bozzi, R., Estellé, J., Ovilo, C., Nieto, R.M., García-Casco, J.M., Pugliese, C., Gil, J.M., Lebret, B. and Oliver, M.A. (2016.): P4033 Characterization and diversity analysis of European local pig breeds and production systems under Treasure project framework. Journal of Animal Science, 94(4): 94-95.

53. Fontanesi, L., Scotti, E., Russo, V. (2008.): Differences of the porcine amelogenin X and Y chromosome genes (AMELX and AMELY) and their application for sex determination in pigs. Molecular reproduction and development, 75(11): 1662-1668.
54. Fontanesi, L. (2009.): Genetic authentication and traceability of food products of animal origin: new developments and perspectives. Italian Journal of Animal Science, 8(2): 9-18.
55. Fontanesi, L, Tazzoli, M, Russo, V., Beever, J. (2010.): Genetic heterogeneity at the bovine KIT gene in cattle breeds carrying different putative alleles at the spotting locus. Animal Genetics, 41: 295-303.
56. Fontanesi, L., Russo, V. (2013.): Molecular genetics of coat colour in pigs. Acta agriculturae Slovenica, 4, 16.
57. Fontanesi, L., Ribani, A., Scotti, E., Velickovi, N. (2014.): Differentiation of meat from European wild boars and domestic pigs using polymorphisms in the MC1R and NR6A1 genes. Meat science, 98: 781-784.
58. Fontanesi, L., Scotti, E., Gallo, M., Costa, L. N., Dall'Olio, S. (2016.): Authentication of “mono-breed” pork products: Identification of a coat colour gene marker in Cinta Senese pigs useful to this purpose. Livestock Science,184: 71-77.
59. Frantz, L. A., Schraiber, J. G., Madsen, O., Megens, H. J., Cagan, A., Bosse, M., Groenen, M. A. (2015.): Evidence of long-term gene flow and selection during domestication from analyses of Eurasian wild and domestic pig genomes. Nature genetics, 47(10): 1141-1148.
60. Fredholm, M., Wintero, A.K., Christensen, K., Kristensen, B., Nielsen, P.B., Davies, W., Archibald, A. (1993.): Characterization of 24 porcine (dA-dC)n-(dT-dG)n microsatellites: genotyping of unrelated animals from four breeds and linkage studies. Mammalian Genome, 4:187–192.
61. Gadsby, N. J., McHugh, M. P., Russell, C. D., Mark, H., Morris, A. C., Laurenson, I. F., Templeton, K. E. (2015.): Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. Clinical Microbiology and Infection, 21(8): 788-e1.
62. Galili, T. (2015.): dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. Bioinformatics, btv428. Chicago
63. Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G. (2009.): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. Molecular Ecology, vol. 18, 4541-4550.

64. Garner, H., Vaksman, Z. (2016.): Prognostic and diagnostic methods based on quantification of somatic microsatellite variability. U.S. Patent 20,160,040,254, issued February 11, 2016.
65. Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Santhosh, F. H., Bhilegaonkar, K. N., Agarwal, R. K., Nagappa, K. (2007.): Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species.Veterinary research communications, 31(4): 447-455.
66. Goedbloed, D. J., Megens, H. J., Van Hooft, P., HERRERO-MEDRANO, J. M., Lutz, W., Alexandri, P., Prins, H. H. T. (2013.): Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals recent genetic introgression from domestic pigs into Northwest European wild boar populations. Molecular ecology, 22(3): 856-866.
67. Grau, R., Hamm, R. (1953.): Eine einfache Methode zur Bestimmung der Wasserbildung im Fleisch. Die Fleischwirtschaft, 4: 295-297.
68. Guo, S.W., Thompson, E. A. (1992.): Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics, 48: 361–372.
69. Haunshi, S., Basumatary, R., Girish, P. S., Doley, S., Bardoloi, R. K., Kumar, A. (2009.): Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin. Meat science, 83(3): 454-459.
70. Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. (2003.): Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270(1512): 313-321.
71. Hrasnica, F., Ilančić, D., Pavlović, S., Rako, A., Malcelj, I. (1958.): Specijalno stočarstvo. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb, 336-339.
72. Hrvatska Poljoprivredna Agencija (HPA) (2016.): Godišnje izvješće 2016.
73. Hofmann, K. (1994.): What is quality? Definition, measurement and evaluation of meat quality. Meat Focus International, 3(2): 73-82.
74. Honikel, H.O. (1988.): The water binding of meat. Fleischwirtsch International, 1:14-22.
75. Hossain, M. M., Ali, M. E., Abd Hamid, S. B., Asing, , Mustafa, S., Mohd Desa, M. N., Sarker, M. Z. I. (2016.): Double Gene Targeting Multiplex PCR-RFLP Assay Discriminates Beef, Buffalo and Pork Substitution in Frankfurter Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry.

76. Hossain, M. M., Ali, M. E., Hamid, S. B. A., Mustafa, S., Desa, M. N. M., Zaidul, I. S. M. (2017.): Targeting double genes in multiplex PCR for discriminating bovine, buffalo and porcine materials in food chain. Food Control, 73: 175-184.
77. Hou, B., Meng, X., Zhang, L., Guo, J., Li, S., Jin, H. (2015.): Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. Meat science, 101: 90-94.
78. Iwobi, A. N., Huber, I., Hauner, G., Miller, A., Busch, U. (2011.): Biochip technology for the detection of animal species in meat products. Food Analytical Methods, 4(3): 389-398.
79. Jadan, M. (2004.): Otkrivanje i analiza polimorfizama jednog nukleotida tehnologijom LightCycler. Biochemia Medica, 14, 109-117.
80. Jančić, S. (1971.): Svinjogojstvo. Poljoprivredni fakultet Zagreb, 1971, 62-64.
81. Janssens, G., Mangelinckx, S., Courtheyn, D., De Kimpe, N., Matthijs, B., Le Bizec, B. (2015.): Simultaneous Detection of Androgen and Estrogen Abuse in Breeding Animals by Gas Chromatography–Mass Spectrometry/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-MS/C/IRMS) Evaluated against Alternative Methods. Journal of agricultural and food chemistry, 63(34): 7574-7581.
82. Jonker, K. M., Tilburg, J. J. H. C., Hägele, G. H., De Boer, E. (2008.): Species identification in meat products using real-time PCR. Food Additives and contaminants, 25(5): 527-533.
83. Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. (2007.): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology, 16: 1099–1106.
84. Karabasanavar, N. S., Singh, S. P., Kumar, D., Shebannavar, S. N. (2014.): Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop. Food chemistry, 145: 530-534
85. Karlsson, A. O., Holmlund, G. (2007.): Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. Forensic science international, 173(1): 16-20.
86. Karolyi, D., Salajpal, K., Sinjeri, Ž., Kovačić, D., Jurić, I.,Đikić, M. (2004.): Meat quality, blood stress indicators and trimmed cut yield comparison of Black Slavonian pig with modern pigs in the production of Slavonian Kulen. Acta agriculturae slovenica, 1: 67-72.
87. Karolyi, D., Luković, Z., Salajpal, K. (2010.): Crna slavonska svinja. Meso, 12 (4): 222-230.

88. Karolyi, D., Luković, Z., Salajpal, K., Đikić, M. (2010.): Black Slavonian pig – a breed for extensive husbandry. Acta agraria kaposvariensis, 14 (2): 221-227.
89. Kauffman, R.G., Cassens, R.G., Sherer, A., Meeker, D.L. (1992.): Variations in pork quality national Pork Producers Council Publication, Des Mointes, USA, 1-8.
90. Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., & Yetim, H. (2009.): Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. Meat Science, 82(4): 444-449.
91. Kijas, J. M. H., Wales, R., Törnsten, A., Chardon, P., Moller, M., Andersson, L. (1998.): Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. Genetics, 150(3): 1177-1185.
92. Kim, S. W., Li, X., Lee, Y. M., Kim, J. J., Kim, T. H., Choi, B. H., Kim, K. S. (2010.): Development of SNP markers for domestic pork traceability.Journal of Animal Science and Technology, 52(2): 91-96.
93. Kim, L. K., Park, C. M., Park, S. A., Kim, S. C., Chung, H., Chai, H. H., Choi, B. H. (2013.): Individual Identification using The Multiplex PCR with Microsatellite Markers in Swine. Reproductive & developmental biology, 37(4), 205-211.
94. Kim, M., Yoo, I., Lee, S. Y., Hong, Y., Kim, H. Y. (2016.): Quantitative detection of pork in commercial meat products by TaqMan® real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region. Food chemistry, 210: 102-106.
95. Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., Wilson, A. C. (1989.): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(16): 6196-6200.
96. Köppel, R., Zimmerli, F., Breitenmoser, A. (2009.): Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. European Food Research and Technology, 230(1): 125-133.Köppel, R., Ruf, J., Rentsch, J. (2011.): Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. European Food Research and Technology, 232(1): 151-155.
97. Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015.): Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. Molecular ecology resources, 15(5): 1179-1191.

98. Kralik, G., Petričević, A., Levaković, F. (1988.): Slaughter value of pigs of different production types. Proceedings 34th international congress of meat science and technology, 29. kolovoza – 2.rujna, Brisbane, 88-90.

99. Kress, W. J., Erickson, D. L. (2012.): DNA barcodes: methods and protocols (pp. 3-8). Humana Press.

100. Kumar, A., Kumar, R. R., Sharma, B. D., Mendiratta, S. K., Sharma, D., Gokulakrishnan, P. (2012.): Species specific polymerase chain reaction (PCR) assay for identification of pig (Sus domesticus) meat. African Journal of Biotechnology, 11(89): 15590-15595.

101. Kumar, D., Singh, S. P., Karabasanavar, N. S., Singh, R., Umapathi, V. (2014.): Authentication of beef, carabeef, chevon, mutton and pork by a PCR-RFLP assay of mitochondrial cytb gene. Journal of food science and technology, 51(11): 3458-3463.

102. Larson, G. i sur. (2005.): Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centres of pig domestication. Science, 307: 1618–1621.

103. Mafra, I., Ferreira, I. M., Oliveira, M. B. P. (2008.): Food authentication by PCR-based methods. European Food Research and Technology, 227(3): 649-665.

104. Lee, J. C. I., Chang, J. G. (1994.): Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. Forensic science international, 67(2): 103-107.

105. Li, S. J., Yang, S. H., Zhao, S. H., Fan, B., Yu, M., Wang, H. S., Li, K. (2004.): Genetic diversity analyses of 10 indigenous Chinese pig populations based on 20 microsatellites. Journal of animal science, 82(2): 368-374.

106. Li, M., Jin, L., Ma, J., Tian, S., Li, R., Li, X. (2016.): Detecting mitochondrial signatures of selection in wild Tibetan pigs and domesticated pigs. Mitochondrial DNA Part A, 27(1): 747-752.

107. Margeta, V. (2012.): Genetska analiza crne slavonske svinje. Poljoprivreda, 18(2): 69-70.

108. Margeta, V. (2013.): Perspektive uzgoja Crne slavonske svinje u Hrvatskoj u kontekstu pristupanja Europskoj Uniji. 48. hrvatski i 8. Međunarodni simpozij agronoma, 17.-22. veljače 2013., Dubrovnik, Hrvatska.

109. Margeta, V., Gvozdanović, K., Galović, D., Grčević, M., Radišić, Ž. (2016.): Proizvodna i klaonička svojstva Crne slavonske svinje u tovu do visokih završnih

tjelesnih težina. 23. Međunarodno savjetovanje KRMIVA 2016,1.-3. Lipanj 2016., Opatija.

110. Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002.): Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. Journal of clinical laboratory analysis, 16(1): 47-51.
111. Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., Pemberton, J. M. (1998.): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology, 7: 639.
112. Michailidou, S., Kalivas, A., Ganopoulos, I., Stea, E., Michailidis, G., Tsaftaris, A., & Argiriou, A. (2014.): A multi-farm assessment of Greek black pig genetic diversity using microsatellite molecular markers. Genetics and Molecular Research, 13(2): 2752-2765.
113. MPS (2010.): Nacionalni program očuvanja izvornih i zaštićenih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj, Zagreb
114. Murugaiah, C., Al-Talib, H., Radu, S. (2015.): Forensics: Food Authentication Using MtDNA. Journal Nutrition Health Food Science, 3: 1-10.
115. Negrini, R., Nicoloso, L., Crepaldi, P., Milanesi, E., Marino, R., Perini, D., Marsan, P. A. (2008.): Traceability of four European protected geographic indication (PGI) beef products using single nucleotide polymorphisms (SNP) and Bayesian statistics. Meat science, 80(4): 1212-1217.
116. Nezer, C., Moreau, L, Wagenaar, D., Georges, M. (2002.): Results of a whole genome scan targeting QTL for growth and carcass traits in a Piétrain x Large White intercross. Genetics Selection Evolution, 34(3): 371 – 387.
117. Nicoloso, L., Crepaldi, P., Mazza, R., Ajmone-Marsan, P., Negrini, R. (2013.): Recent advance in DNA-based traceability and authentication of livestock meat PDO and PGI products. Recent patents on food, nutrition & agriculture, 5(1): 9-18.
118. Ni'mah, A., Pratama, A. D., Kartikasari, L. R., Hertanto, B. S., Cahyadi, M. (2016.): Detection of pork contamination in fresh and cooked beef using genetic marker mitochondrial-dna cytochrome b by duplex-p. Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture, 41(1): 7-12.
119. Oh, J. D., Song, K. D., Seo, J. H., Kim, D. K., Kim, S. H., Seo, K. S., Kang, M. S. (2014.): Genetic traceability of black pig meats using microsatellite markers. Asian-Australasian journal of animal sciences, 27(7): 926.
120. Ollivier, L., Alderson, L., Gandini, G. C., Foulley, J. L., Haley, C. S., Joosten, R., Rattink, A.P., Harlizius, B., Groenen, M.A.M., Amigues, Y., Boscher, M.Y., Russell,

G., Law, A., Davoli, R., RussO, V., Matassino, D., De´saute´, C., Fimland, E., Bagga, M., Delgado, J.V., ega-Pla, J.L., MartineZ, A.M., Ramos, A.M., Glodek, P., Meyer, J.N., Plastow, G.S., Siggens, K.W., Archibald, A.L., Milan, D., San Cristobal, M., Laval, G., Hammond, K., Cardellino, R., Chevalet, C. (2005.): An assessment of European pig diversity using molecular markers: Partitioning of diversity among breeds.Conservation Genetics, 6(5): 729-741.ž

121. Orrù, L., Napolitano, F., Catillo, G., Moioli, B. (2006.): Meat molecular traceability: How to choose the best set of microsatellites?. Meat Science,72(2): 312-317.
122. Ovilo, C., Rodriganez, J., Rodrıguez, M.C., Silio, L. (2002.): Estimation of coancestry in Iberian pigs using molecular markers. Conservation Genetics 3, 309–20.
123. Pailhoux, E., Cotinot, C., Popescu, P. C., Boscher, J., Legault, C., Fellous, M., Molteni, L. (1994.): Genetic analysis of 38XX males with genital ambiguities and true hermaphrodites in pigs. Animal genetics, 25(5): 299-305.
124. Paradis E., Claude J., Strimmer K. (2004.): APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. Bioinformatics. 20: 289–290.
125. Pardo, E., Cavadía T.I., Melendez, I. (2015.): Genetic diversity of domestic pigs in Tierralta (Colombia) using microsatellites. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 28 (3): 272-278.
126. Peakall, R., Smouse P.E. (2012.): GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28: 2537-2539.
127. Petkov, S.G., Reh, W.A., Anderson, G.B. (2009.): Methylation Changes in Porcine Primordial Germ Cells. Molecular Reproduction and Development, 76: 22-30.
128. Petri, A., Pfannebecker, J., Fröhlich, J., König, H. (2013.): Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. Food microbiology, 33(1): 48-54.
129. Petričević, A., Kralik, G., Petrović, D. (1988.): Participation and quality of some tissue in pig carcasses of different production. Proceedings 34th international congress of meat science and technology, 29. kolovoza – 2.rujna, Brisbane, 68-70.
130. Petrov, A., Beer, M., Blome, S. (2014.): Development and validation of a harmonized TaqMan-based triplex real-time RT-PCR protocol for the quantitative detection of normalized gene expression profiles of seven porcine cytokines. PloS one, 9(9): 108910.
131. Pfeiffer, I., Burger, J., Brenig, B. (2004.): Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. BMC genetics, 5(1): 30.

132. Poloumienko, A. (2004.): Cloning and comparative analysis of the bovine, porcine, and equine sex chromosome genes ZFX and ZFY. Genome, 47(1): 74-83.
133. Pravilnik o zaštićenim oznakama izvornosti, zaštićenim oznakama zemljopisnog podrijetla i zajamčeno tradicionalnim specijalitetima poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda (NN br. 65/15)Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155:945–959.
134. R Core Team (2013.): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/.
135. Rastogi, G., Dharne, M. S., Walujkar, S., Kumar, A., Patole, M. S., Shouche, Y. S. (2007.): Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. Meat science, 76(4): 666-674.
136. Ramos, A. M., Megens, H. J., Crooijmans, R. P. M. A., Schook, L. B., Groenen, M. A. M. (2011.): Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing. Animal genetics, 42(6): 613-620.
137. Rohrer, G. A., Freking, B. A., Nonneman, D. (2007.): Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. Animal genetics, 38(3): 253-258.
138. Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., Martín, R. (2009.): Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region. Poultry science, 88(3): 669-679.
139. Rousset, F. (2008.): Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. Mol. Ecol. Resources, 8: 103-106.
140. Russo, V., Bosi, P. Nanni Costa, L. (1987.): In Evaluation and Control of Meat Quality in Pigs, ed. P. V. Tarrant, G. Eikelenboom & G. Monin. Martinus Nijhoff, Dordrecht, p. 211.
141. Russo, V., Fontanesi, L., Scotti, E., Tazzoli, M., Dall'Olio, S., Davoli, R. (2007.): Analysis of melanocortin 1 receptor (MC1R) gene polymorphisms in some cattle breeds: their usefulness and application for breed traceability and authentication of Parmigiano Reggiano cheese. Italian Journal of Animal Science, 6(3): 257-272.
142. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985.): Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and

restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230(4732): 1350-1354.

143. Salajpal, K., Karolyi, D., Kantura, V., Nejedli, S., Đikić, M. (2007.): Muscle Fiber Characteristics of Black Slavonian Pig–Autochthonous Croatian Breed. In 6th International Symposium on the Mediterranean Pig (p. 293).
144. Saitou, N., Nei, M.(1987.): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular biology and evolution 4(4): 406-425.
145. Scali, M., Vignani, R., Quintetti, M., Bigliazzi, J., Paolucci, E., Cresti, M. (2015.): Genetic Traceability of Cinta Senese Pig (Sus scrofa domesticus L.): A Study of the Meat and Processed Products by Microsatellite Markers. Food and Nutrition Sciences, 6(8): 712.
146. Schmoll, F., Schellander, K. (1996.): Sex determination of porcine embryos by restriction fragment lenght polymorphism analysis of ZFX/ZFY loci. Theriogenology, 1(45): 255.
147. Schwab, C.R., Mote, B.E., Du, Z.Q., Amoako, R., Baas, T.J., Rothschild, M.F. (2009.): An evaluation of four candidate genes for use in selection programmes aimed at increased intramuscular fat in Duroc swine. Journal of Animal Breeding and Genetics, 126: 228-236.
148. Senčić, Đ., Antunović, Z., Steiner, Z., Rastija, T., Šperanda, M. (2001.): Fenotipske značajke mesnatosti crne slavonske svinje – ugrožene pasmine. Stočarstvo 55 (6): 419-425.
149. Senčić, Đ., Antunović, Z., Kanisek, J., Šperanda, M. (2005.): Fattening, meatness and economic effeciency of fattening pigs. Acta veterinaria 55 (4): 327-334.
150. Senčić, Đ., Samac, D., Antunović, Z., Novoselec, J., & Klarić, I. (2010.): Utjecaj razine sirovih proteina u krmnim smjesama na kvalitetu polovica i mesa crnih slavonskih svinja. MESO: prvi hrvatski časopis o mesu, 12(1): 28-33.
151. Sforza, S. (2013.): Food authentication using bioorganic molecules. DEStech Publications, Inc.
152. Shackell, G. H., Mathias, H. C., Cave, V. M., Dodds, K. G. (2005.): Evaluation of microsatellites as a potential tool for product tracing of ground beef mixtures. Meat science, 70(2): 337-345.
153. Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P., Mafra, I. (2013.): A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. Meat Science, 94(1): 115-120.

154. Sokal, R, Michener, C. (1958.): A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas Science Bulletin. 38: 1409–1438
155. Spychaj, A., Szalata, M., Słomski, R., Pospiech, E. (2016.): Identification of Bovine, Pig and Duck Meat Species in Mixtures and in Meat Products on the Basis of the mtDNA Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) Gene Sequence. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 66(1): 31-36.
156. Sumathi, G., Jeyasekaran, G., Shakila, R. J., Sivaraman, B., Arunkumar, G., Manimaran, U., Sukumar, D. (2015.): Molecular identification of grouper species using PCR-RFLP technique. Food Control, 51: 300-306.
157. Świtoński, M., Jackowiak, H., Godynicki, S., Klukowska, J., Borsiak, K., Urbaniak, K. (2002.): Familial occurrence of pig intersexes (38, XX; SRY-negative) on a commercial fattening farm. Animal reproduction science, 69(1): 117-124.
158. Šprem, N., Salajpal, K., Safner, T., Đikić, D., Jurić, J., Curik, I., Cubric-Curik, V. (2014.): Genetic analysis of hybridization between domesticated endangered pig breeds and wild boar. Livestock Science, 162: 1-4.
159. Taly, V., Pekin, D., Benhaim, L., Kotsopoulos, S. K., Le Corre, D., Li, X., Blons, H. (2013.): Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. Clinical chemistry, 59(12): 1722-1731.
160. Tagliavia, M., Nicosia, A., Salamone, M., Biondo, G., Bennici, C. D., Mazzola, S., Cuttitta, A. (2016.): Development of a fast DNA extraction method for sea food and marine species identification. Food chemistry, 203, 375-378.
161. Takezaki, N., Nei, M., Tamura, K. (2010.): POPTREE2: software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population tatistics with Windows interface. Molecular Biology and Evolution, 27: 747-752.
162. Teletchea, F., Bernillon, J., Duffraisse, M., Laudet, V., Hänni, C. (2008.): Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. Journal of Applied Ecology, 45: 967–975.
163. Tsoi, S., Blanes, M., Chen, T. Y., Langendijk, P., Athorn, R., Foxcroft, G., Dyck, M. (2016.): Identification of differentially expressed genes in sexed pig embryos during post-hatching development in primiparous sows exposed to differing intermittent suckling and breeding strategies. Genomics Data, 9: 30-34.

164. Ugochukwu, A. I., Hobbs, J. E., Phillips, P. W., Gray, R. (2015.): An economic analysis of private incentives to adopt DNA barcoding technology for fish species authentication in Canada 1. Genome, 58(12): 559-567.

165. Uremović, M. (1995.): Crna slavonska svinja ulazi u fazu izčezavanja. Agronomski glasnik, 57 (4-5): 311-316.

166. Uremović, M., Uremović, Z., Luković, Z. (2000.): Production properties of the Black Slavonian pig breed. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo Zootehnika 76: 131-134.

167. Uremović, M., Uremović, Z., Luković, Z., & Konjačić, M. (2003).: The influence of genotype and production conditions on the fertility of sows in outdoor system. Agriculturae Conspectus Scientificus, 68(4), 245-248.

168. Uremović, M., Uremović Z., Luković, Z. (2006.): Utjecaj genotipa i načina hranidbe na rezultate u tovu svinja. Proceedings of the 41st Croatian & 1st International Symposium on Agriculture, Opatija, 2006, 667-668.

169. Ursing, B. M., Arnason, U. (1998.): The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (Sus scrofa). Journal of Molecular Evolution, 47(3): 302-306.

170. Van Asch, B., Pereira, F., Santos, L. S., Carneiro, J., Santos, N., Amorim, A. (2012.): Mitochondrial lineages reveal intense gene flow between Iberian wild boars and South Iberian pig breeds. Animal genetics, 43(1): 35-41.

171. Van den Broeke, A., Aluwé, M., Tuyttens, F.A.M., Ampe, B., Vanhaecke, L., Wauters, J., Janssens, S., Coussé, A., Buys, N., Millet, S. (2015.): An intervention study demonstrates effects of genotype on boar taint and performances of growing–finishing pigs. Journal of animal science, 93(3): 934-943.

172. Van Raamsdonk, L. W. D., Von Holst, C., Baeten, V., Berben, G., Boix, A., De Jong, J. (2007.): New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. Animal Feed Science and Technology, 133(1): 63-83.

173. Vega-Pla, J. L., Martínez Martínez, A., Delgado-Bermejo, J. V., Cabello, A., Escribano, F. (2003.): Negro de Los Pedroches, the molecular definition of a new variety of the iberian pig breed. Archivos de Zootechnica 52: 219-223

174. Venkatachalapathy, R. T., Sharma, A., Sukla, S., Bhattacharya, T. K. (2008.): Cloning and characterization of DGAT1 gene of Riverine buffalo: Full Length Research Paper. DNA Sequence, 19(3): 177-184.

175. Veselenak, R. L., Miller, A. L., Milligan, G. N., Bourne, N., Pyles, R. B. (2015.): Development and utilization of a custom PCR array workflow: analysis of gene

expression in mycoplasma genitalium and guinea pig (Cavia porcellus). Molecular biotechnology, 57(2): 172-183.

176. Vykoukalova, Z., Knoll, A., Dvorak, J., Cepica, S. (2006.): New SNP's in the IGF2 gene and association between this gene and backfat thickness and lean meat content in Large White pigs. Journal of Animal Breeding and Genetics, 123: 204-207.
177. Quinto, C. A., Tinoco, R., Hellberg, R. S. (2016.): DNA barcoding reveals mislabeling of game meat species on the US commercial market. Food Control, 59: 386-392.
178. Qiao, R., Gao, J., Zhang, Z., Li, L., Xie, X., Fan, Y., Cui, L., Ma, J., Ai, H., Ren, J., Huang, L., (2015.): Genome-wide association analyses reveal significant loci and strong candidate genes for growth and fatness traits in two pig populations. Genetics Selection Evolution, 47(1): 1.
179. Wang, C., Xu, L.L., Wu, Y.H., Du, X.Y., Huo, X.Y., Gao, J., Li, Z.K., Li, Y.C. and Chen, Z.W. (2015.): Selected representative microsatellite loci for genetic monitoring and population structure analysis of miniature swine. Genetics and molecular research: GMR, 14(2): 3910.
180. Weir, B.S., Cockerham, C.C. (1984.): Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38: 1358–1370.
181. Weir, B. S. (1996.): Genetic data analysis II. Sinauer, Sunderland, MA.
182. Weir, B. S., Ott, J. (1997.): Genetic data analysis II. Trends in Genetics, 13(9), 379.
183. Wu, X., Liu, H., Jiang, Z. (2006.): Identification primers for sika deer (*Cervus nippon)* from a sequence-characterised amplified region (SCAR). New Zealand Journal of Zoology, 33(1): 65-71.
184. Zakon o zaštićenim oznakama izvornosti, zaštočenim oiznakama zemljopisnog podrijetla i zajamčeno tradicionalnim specijalitetima poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda, NN br. 80/13, 14/14, 30/15.
185. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J., (1994.): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, 372: 425-431.

7. SAŽETAK

Istraživanje je provedeno na 107 životinja od kojih je bilo 50 svinja crne slavonske pasmine (CS), 15 PIC hibrida, 12 pietrena (P), 10 topigsa (TP), 10 velikih jorkšira (J), 5 landrasa (L) i 5 duroka (D). Od ukupno analiziranih 100 svinja crne slavonske pasmine kod kojih smo odredili genotip *MC1R* gena odabrano je 30 životinja homozigota za crnu boju (CS), te 20 životinja heterozigota (CSX). Cilj istraživanja bio je utvrditi genetski status crne slavonske svinje pomoću seta od 26 mikrosatelitska markera te optimizirati najmanji broj mikrosatelita dovoljnih za identifikaciju pasmine te autentifikaciju proizvoda načinjenih od iste.

Prema preporuci ISAG-FAO odabran je set od 26 mikrosatelitna lokusa (S0026, S0155, S0005, Sw2410, Sw830, S0355, Sw24, Sw632, Swr1941, Sw936, S0218, S0228, Sw122, Sw857, S0097, sw240, IGF1, Sw2406, Sw72, S0226, S0090, Sw2008, Sw1067, S0101, S0178, Sw911 i S0002) grupirana u tri združene PCR reakcije. Dobiveni PCR produkti su analizirani pomoću ABI 3730XLs (Applied Biosystems).

Analizom genetske strukture populacija utvrđena je niska genetska udaljenost između CS i CSX skupina, no visoka genetska udaljenost s ostalim pasminama. Analizom frekvencije gena identificirano je 15 privatnih alela specifičnih za skupinu crnih svinja homozigota na *MC1R* genu, te 10 privatnih alela specifičnih samo za heterozigote na *MC1R* genu. Prosječan broj alela po lokusu se kretao od 2,61 do 6,54 što ukazuje na veliku genetsku raznolikost. Optimizacijom broja mikrosatelitskih lokusa temeljenom na frekvenciji alela, broju privatnih alela, vrijednosti informacijskog sadržaja polimorfizma te izračunu vjerojatnosti identiteta utvrđen je set od pet markera koji su dovoljno informativni za identifikaciju pasmine i autentifikaciju proizvoda. Koristeći navedeni set moguće je identificirati crnu slavonsku pasminu od koje su proizvedeni proizvodi napravljeni od pojedinačnih životinja (šunka ili pršut), međutim identifikacija u kobasičarskim proizvodima nije izvediva zbog većeg broja životinja korištenih pri proizvodnji ovakvih proizvoda, što za ovaj tip analize i veliku polimorfnosti mikrosatelitskih markera nije pogodno.

8. SUMMARY

The study was conducted on 107 animals, of which there were 50 pigs Black Slavonian breed (CS) 15 PIC hybrids, 12 Pietrain (P), 10 Topigs (TP), 10 Large White (J), 5 Landrace (L) and 5 Duroc (D). The *MC1R* genotype was determine in 100 Black Slavonian pigs and there was choosen 30 animals homozygous (CS) for *MC1R* and 20 animals heterozygous (CSX) for MC1R gen. The aim of this study was to determine the genetic status of the Black Slavonian pig with a set of 26 microsatellite markers optimize the smallest number of microsatellite markers that are sufficient for breed identification and product authentication.

According to the recommendation ISAG-FAO selected set of 26 microsatellite loci (S0026, S0155, S0005, Sw2410, Sw830, S0355, SW24, Sw632, Swr1941, Sw936, s0218, s0228, Sw122, Sw857, S0097, sw240, IGF1, Sw2406, Sw72 , s0226, S0090, SW2008, Sw1067, S0101, S0178, S0002, Sw911) that were grouped into 3 multiplex reactions. Obtained PCR products were analysed with ABI 3730XLs (Applied Biosystems).

By analysing the genetic structure of populations showed low distance between the two groups of Black Slavonian breed, but a high genetic distance to other breeds. Analysis of allele frequency was found 15 private allele specific for black pigs homozygous the *MC1R* gene, and 10 private alleles specific for hybrids. The average number of alleles per locus ranged from 2.61 to 6.538 indicating a great genetic diversity. The optimization of the number of microsatellite loci was based on the frequency of alleles, the number of private alleles, the value of polymorphism information content and calculation of probability of identity. The number of microsatellite loci was optimized and analysis was provided a set of five microsatellite markers that were sufficiently informative for breed identification and product authentication. With a set made of 5 microsatellite markers, it is possible to identify the breed from which are certain food products are produced, such as ham. Identification in other kind of products is not possible because such products are produced by a large number of animals witch is not suitable for this type of analysis because of high microsatellite polymorphism.

9. PRILOG

Prilog 1. Sekvence mikrosatelitnih markera korištenih u istraživanju

SOO26 (L30152.1)

1 gatcagtttg tcatgtagat atggaaggcc caaagagttg tacaatccca gtggaatcct
61 ctacacactc atacaaacac acacacacac acacacacac acacacacac acagagcaac
121 tagtatgtcc tacctnacaa attcagaata caaatacagt catttcaccc ttctttttgc
181 ttgaatattc aaacaccctc atgccctatt agcaagaagt ggtatcttga gatatcctcc
241 actctaacca gtccagtgat c

SO155 (JQ342091.1)

1 tgttctctgt ttctcctctg tttgcaaata catgtgccca cacactcaca cacacactac
61 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac aaattgttgg ggggaaatga
121 gtttttaaga caacatatat agccattgac tctttccact tt

S0005 (BX465805.1)

1 aagcttgtgn agtacatgac tttgaagtct gatctaaaga aggtgggagc tggggagaga
61 tgaccttttt tttttttttt tt

SW632 (AF225099.1)

1 gatcacagta acacattaat ttcagtttaa atatttcaaa aaaatgggtt gaaagatttc
61 ccaacctttg tttgttgttt gatacacatt gtattttgtt tgggaagaag tgtaacacag
121 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acgtatttga agtttgaaat
181 ttatttttgg atagtatcaa gccaaagtac tgactcctat ttcagtaatg gatc

SW1941 (AF253904.1)

1 catgagttag aaagcaattt gatttgcata atctgctgga ttttttaatt gaagtatagt
61 tgatttatga tgttatgtta gttttaggtg tacagcaaag tgattcagtt ttgcatacat
121 tatatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtattct tttcccttat
181 aggttactac aaaatattga gtatagtttc ctgtgctata cagtaggtcc ttgttagtta
241 tctat

SW2410 (AF207836.1)

1 tcagcttttc tgtaactcga gttggtgcaa ccacaggatg aagcagacat ttgcccccaa
61 ggtatttcta gagccctgtc cagggccagg gcgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt
121 gtgcacacag tgaagcttct accctccaca ccctggcggg cag

SW830 (AF235378.1)

1 gatgtttttg attagttact ttgagggcat atctttctat ctgtttgaaa gctattaatg
61 cataagtacc atggagaggg aaatgtagtc acagatgagg ggtttaagtt cacataaaag
121 cagcaagctg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt cacgactgtc
181 ctcaacatgt gtatggagag acttctctgg tgacattcac tatcactgga ccatacacag
241 gtctttggaa ccatgttagg tggatc

SO355 (L29049.1)

1 gatcaaggta agtgcttgat gccacttatg cataaagagg tactgagcta ccctctcttt
61 aaacaagtca gcacagctgt acgaaaggac atgcttgagc tggccttaaa gaatgagtag
121 ctttcaccat atgagtaagg acagttgtcc actagtggtt cagacagcac cccagtgtat
181 gatgtgattt ttagaggcat agcccagttc tggctcctac actccttctt gatgctgctt
241 gaagggttta gttcttgtcc ttttctcctc actccctgtt gtaccgtcag taaaacacac
301 acacacacac acacacacac acacacacac actctactac tactgggatt caagtgtctg
361 ctcctcaagt aaaaaccaaa gtatttcatt catctcatga aagaaggaga attcagaagg
421 gtattcctca ctttatncnt aaaactccta tttttcagca cccacccaac agngctcatt
481 tttggcccaa acactgttct ggaaccatcc aacangtggg gaaggaaagg tgggggccgg
541 ngggggnagg gggcagttgn tntttaaacc ncaaaccggc ctngnatnga agggtttttn
601 caaccntntt gggggttttn tttttttnaa ccttaactgg ggcgggttaa ggtctttttg
661 ttccccattt gaaggtccct ttcgggggcc tttaggggga ntttgggggg cccttgttgg
721 nctttactcc acnaccacgg g

SW9366 (AF225107.1)

1 gatctgactt aaatctctct ggagctagca taagtgccat cctctggaaa tacagaagag
61 cctgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtccc tgcatgtgta
121 cttgcacatg tgctgggaaa ttagagggaa atattacagt gaaataggta cacagatc

S0218 (L29048.1)

1 gagctggcat tgctgtgagc tgtggtgtag gctggcggtt gtacctctga tttgacccct

61 agcctgggaa cctccatatt ctgtgggtgt ggctgtaaaa agatacacac acacacacac

121 acacacacac acacacacac acacacaaat cccgctaaca catggtaggc attcaagatt

181 gtcacctttg ctttaggttt cagggttaga ctgctgacct

SO218 (L29195.1)

1 gatcggcatt atgtggctcg gcataggctg gcagcaacag ctatgcttag tgccccagcc

61 tgggtacctc catatgcttc aggtgcccat acacacacac acacacacac acacacacac

121 acacggcaga aattaactaa ccaatgtcta aacaatagaa tacgtgatat aaacattgtt

181 gcgtctgcac aaaaaacaaa attttagttt cttgtatatg gtagtgtaga taagatgagg

241 tgggctgaaa ttaaatttgg gtctgtgagg gcgggttatg cctaaccctg cactctagtc

301 catactgtat ccgtctgttt tcactagttg atatctttga gggnttgtgt ttggggattg

361 aggtggaggc tggtgtagga agcaacttcc tctctacttt cgaattgaca cttgggaaaa

421 agattggttg aggcttaggg gcaccaggct tttgaatgcc cggggttgca gaaggtgaag

481 ggcngagcca aactgaggtt ggaggagagg gatatt

SW240 (AF235246.1)

1 gaatttattg gttacctcaa cataacctag cttgttcaga ctgatataga aattagtgcc

61 tcaaattggt gctagaacta aatatgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta

121 tagcatttgc tagggactta atggtttaaa aacaaggatc

IGF1 (NM_214256.1)

1 tacaaggtta agatgcacat cacatcctct tcgcatctct tctacttggc cctgtgcttg

61 ctctccttca ccagctctgc cacggctgga cctgagaccc tctgtggggc tgagctggtg

121 gacgctcttc agttcgtgtg cggagacagg ggcttttatt tcaacaagcc cacagggtac

181 ggctccagca gtcggagggc gccacagacg ggcatcgtgg atgagtgctg cttccggagc

241 tgtgatctga ggaggctgga gatgtactgt gcacccctca agcctgccaa gtcggcccgc

301 tccgtccgtg cccagcgcca cacggacatg cccaaggctc agaaggaagt acatttgaag

361 aacacaagta gagggagttc aggaaacaag aactacagaa tgtaggaaga ccttcctgaa

421 gagtgaagaa tgacatgcca ctggcaggat cctttgctct gcacgagtta cctgttaaac

481 accagaagac ctaccaaaaa aataagtttg aaaacatttc aaaagatggg cattcccccc

541 aatgaaatac acaagtaaac attcccg

SW2406 (AF225140.1)

1 gatcctaaaa ggctccagga tgtacagttg ttgaaatgtc acctttaaga cgtgggtatt

61 gatttacagt ttgcattcct aagtacagag gatactggac tagcagggga aaaaaaaatn

121 ccaatttctg catctcagtg aaggagaagg ctaagtcatg tttggtatca tctgtcagaa

181 gactgtgggt tttgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgag cacacatgtg

241 ctaattcagg agtttcgcat tgaatgactt ccttgatggt aagtttaaga ctt

SW122 (AF235206.1)

1 tctttatata agttttgtct ttgatataag tttagaagac aaattttaga agctctttat

61 ataagttttg tctttgatat aagttgcaag tattttttct ttggtttttc atttgtcttt

121 ttattttgct tttggtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtttaaatca

181 tgcaaaagtt tcttatttta aattgtaaaa tgtgtcaatc ttttgccttt tttgatc

SW857 (AF225105.1)

1 cagtgagagg tcagttacag aagaccacac acacacacac acacacacac acacacacac

61 acacacacac gcatgcctat gcactagaaa ggactggaag aacataccaa gcattaccaa

121 tgcttagtca cctctgagga atgggatttg gaggaggatc

SO097 (M95020.1)

1 ccattaaatt gccatcatgc gacctatcta atgtcattat agtccagttc tggagaagca

61 gagaaataaa agaaaaaaaa atgactcaat taccaatgta tgtgttctca gacttcaaaa

121 gagcctgaag gtacacgtgt ctgtaggaga tggaacggtg caaacacaca cacacacaca

181 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca gagccaccct tcggagggga

241 agtttgtcaa ctctaggagg aagagaatta ctaaactaaa gcttcatttg gatgtgagcc

SW72 (AF235346.1)

1 gatcagaaca gtgcgccgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgcg tacacaccgt

61 gtgtatctgc ctcaggacaa tctcctgctt gggaaacacc ccattttcaa agccccgccg

121 atc

S0226 (L29230.1)

1 taaaacttaa tagcataagt tgtgcttatt aagaaaattg atatcttcat tcaggtgatt

61 gtgagactga ttgtgaaaca gaaaggagga aagtaaagat acttgggaaa tcagaaaact

121 ggtctttatt agtgaaaact gcactagtga aataggatta gggctttnct tcaaatttta
181 cactgtcttg tcttaagatt atttttttac caattgcctt agagatatag tcttcttagg
241 tgatagaaat aggttaaact tttnccccaa tacatatata cacacacata cacacacatg
301 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacacc natagtccnc ttctagatag
361 tgaggatata tncagtgaag agccccaaat cccagctctc atggagcttt ttantctgct
421 ggagtatcat gaaagttaaa agtgcnttaa atgtgatata gcttaatagt tagaaaattg
481 gtcctttaag gagtgatgct tatattttaa tattccatgg tatggcagtg tccaggtatt
541 cagacttcat acatgatggg ttacataagg aaggatgcgg aaacttccag tcatcttnaa
601 atttaggtgt ggacctggca tggtgttact ttcatcacac tgtgttggtc attgcaggca
661 caggcggagt tcctgttgtg tctcagtggg aacaaacctg actggtatcc atgaggatgc
721 aggtttgatc

S0090 (M95002.1)

1 ccaagactgc cttgtaggtg aataaattca tgctactttt tctttttctc tttttatagt
61 ttgtctctgc ttcctttcaa cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca
121 cacacacagc cattggacag gctgataaaa tcctttatta tttatatata ttattatata
181 gatattatac atattatatg aattatatct atatttatgt atctccaacc taatggtaca
241 atacttgata gccttgagta t tgaacct

SW911 (AF225106.1)

1 gatctctcag ttctttggga ctgaacccca gactgcagtg gtgaaagcac caagtcctaa
61 ccactgaacc accagggaac tccccaccct cacatttttc tttattcatt tacacacaca
121 cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacactgg ctttttttt ccacagatgg
181 gatc

S0002 (JQ396261.1)

1 gaagccaaag agacaactgc ttggagtccc tgtggggtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt
61 gtgtgtgtgt gtgtgtgatg aatgtggtgt ggggttatca ctgggacagt aatggaagca
121 caatttctcc cactgctcag gtacattaga aaatgaaatc tgggagttcc cttgtggctc
181 agtgggtaaa gaac

SW2008 (AF253773.1)

1 gatcttttat ccttgccctg aaaagtaaat aggattggtc taggtgaagg tggaagtggg

61 aagagaggag gaaataaggg gtaagcattc aggaagaagg cattgcctag gtaacgccac

121 aaagtaggaa gggacatgat gaagggaaca gaaagcaggc cagagtagcg tgcgtgaggt

181 gtgtgtgtat gcgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtga acacatgtta

241 tttttgggag gactgactac taggaaatgc ccaagagccc aagatgaggc tagagaagta

301 gaaagggccc aggatc

SW1067 (AF235183.1)

1 ctgactgctg gccagtgact ctgcctctgt ctgtctctgt gtctgtccct gtttctctct

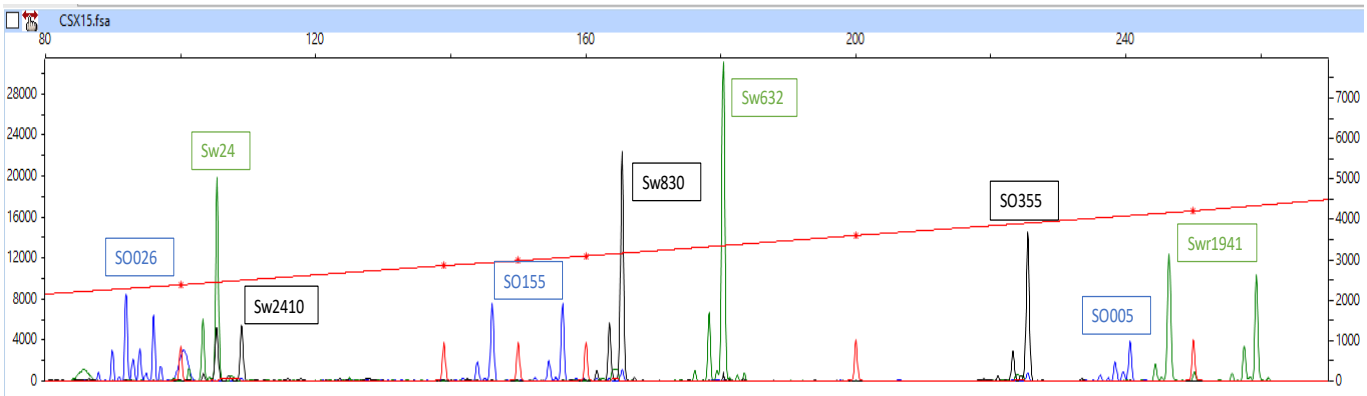
61 ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctcacaca cacacacaca cacacacaca

121 cacacacaca cacacacacg cctannngac agagcagaac tttttgttta atcccccggt

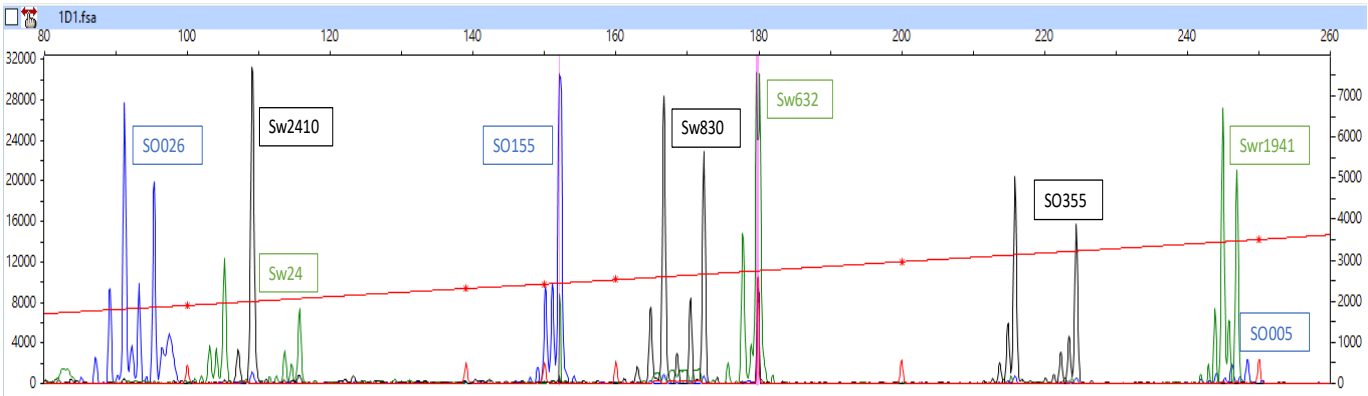
181 ttatctttct ctgnctcaca gcctggtgtg gagcttggag cggatc

Prilog 2. Elektroferogram analize prve, druge i treće združene reakcije za istraživane pasmine

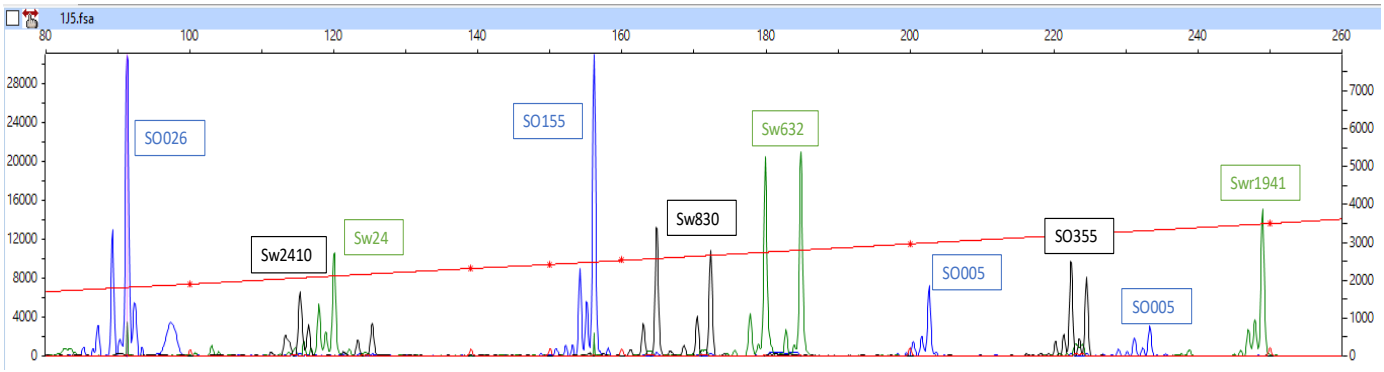
Optimizacija prve združene reakcije



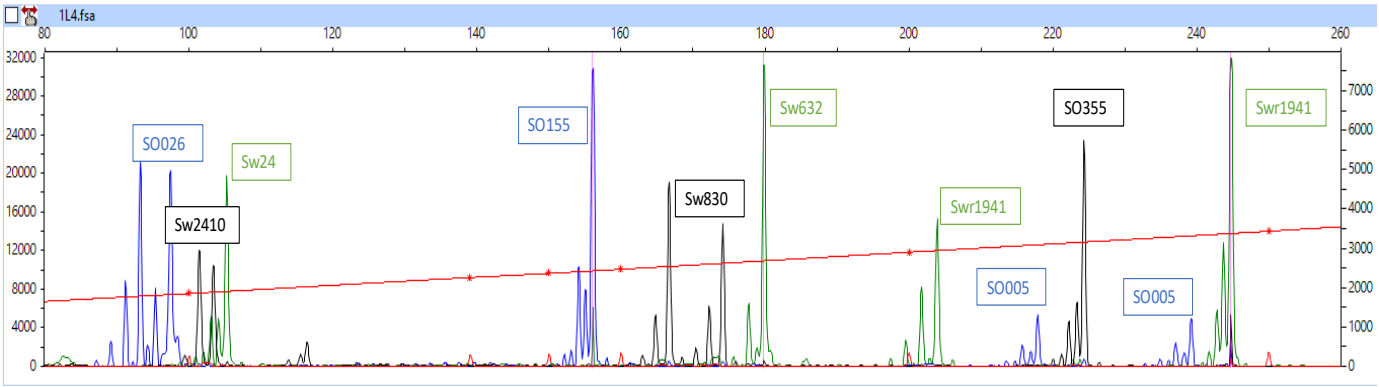
Genescan analize prve združene reakcije crna slavonska (CSX)



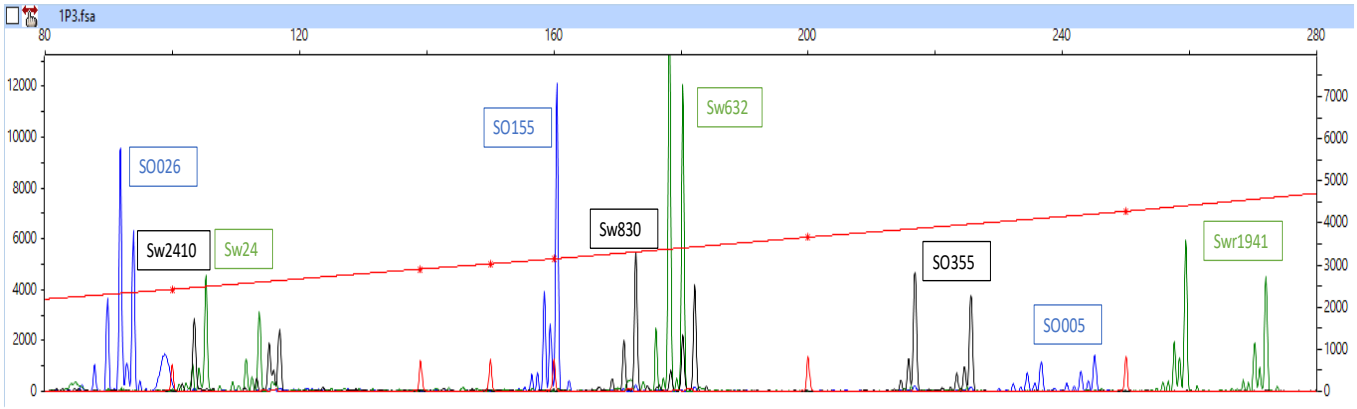
Genescan analize prve združene reakcije (D)



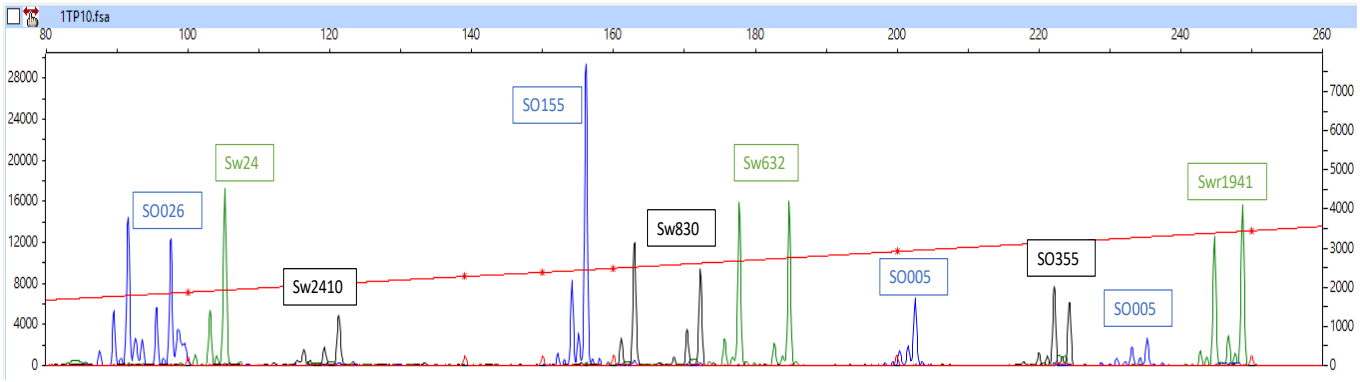
Genescan analize prve združene reakcije (VJ)



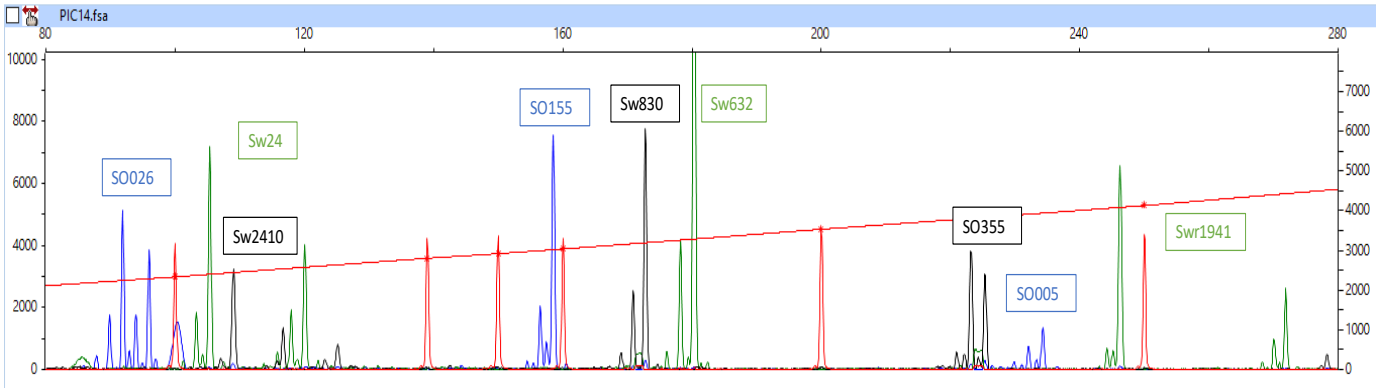
Genescan analize prve združene reakcije (L)



Genescan analize prve združene reakcije (P)

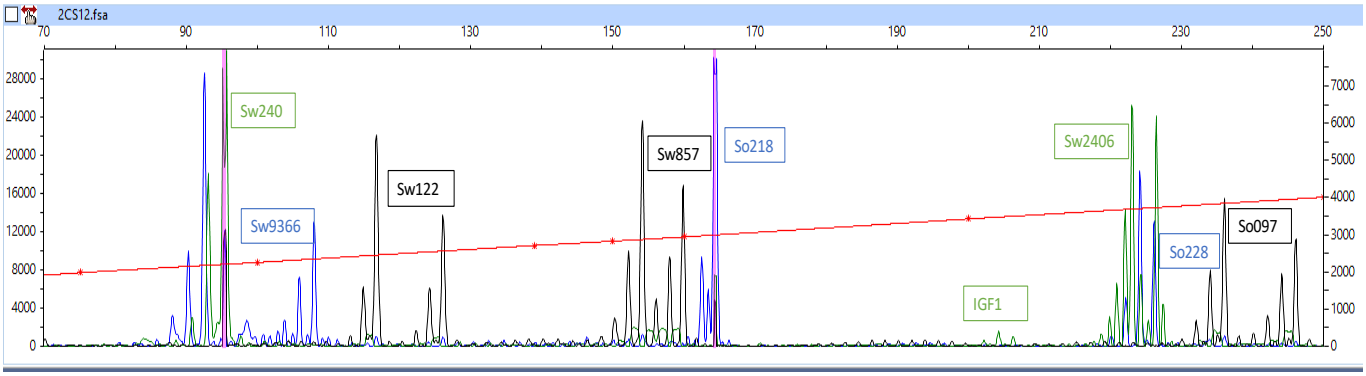


Genescan analize prve združene reakcije (TP)

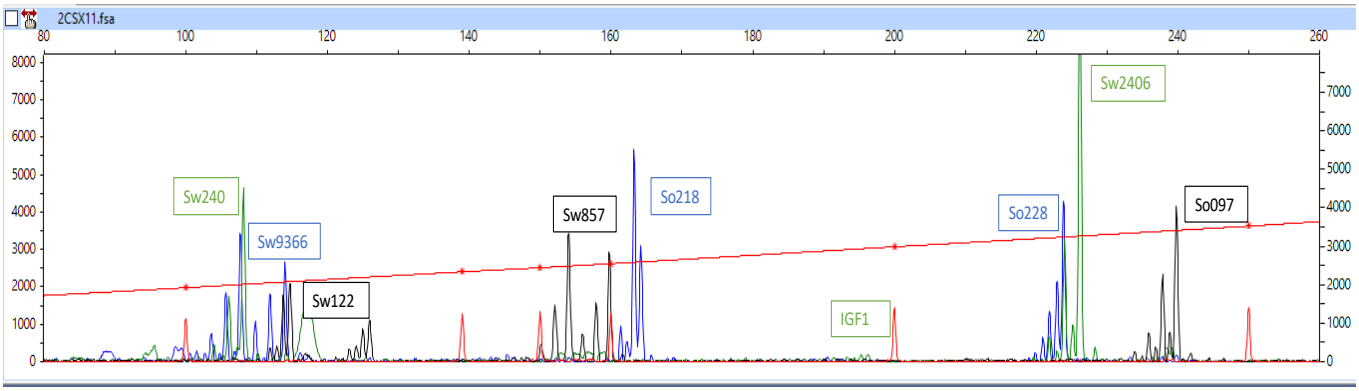


Genescan analize prve združene reakcije (PIC)

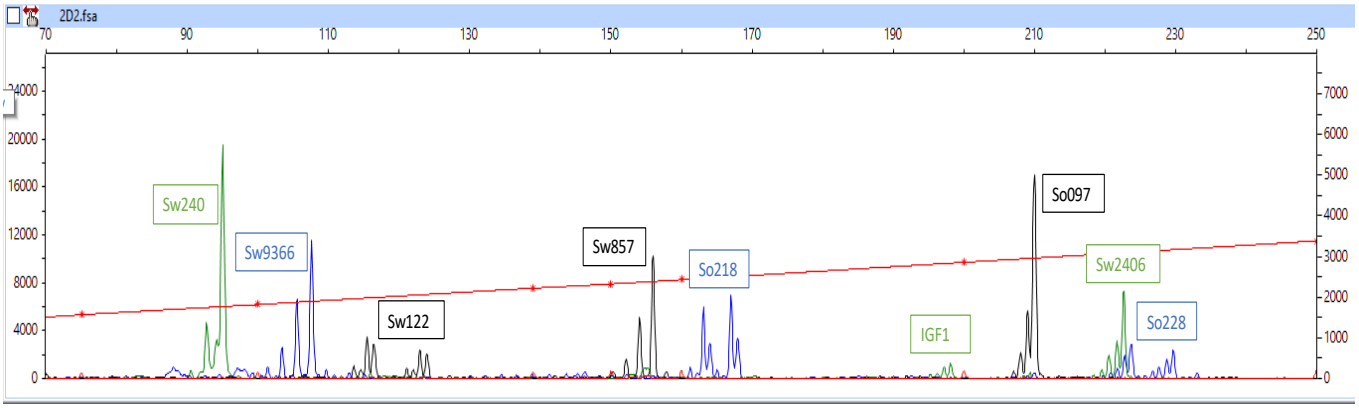
Optimizacija druge združene reakcije



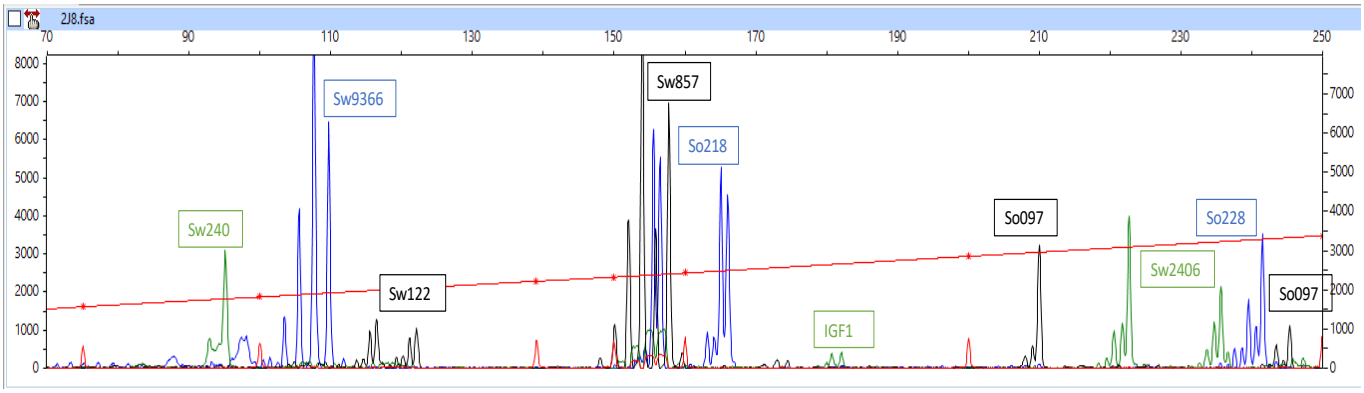
Genescan analize druge združene reakcije - crna slavonska



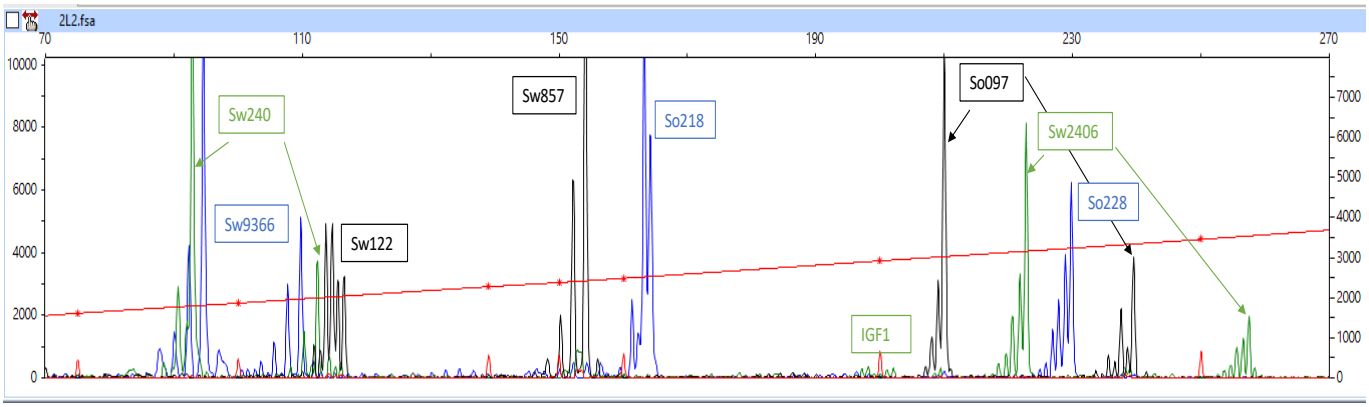
Genescan analize druge združene reakcije crna slavonska (križanac po boji)



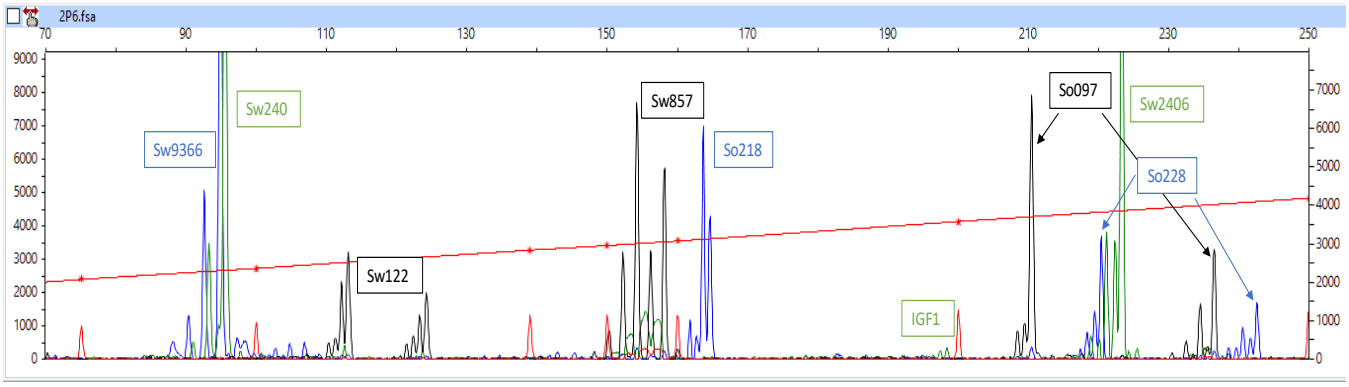
Genescan analize druge združene reakcije – durok



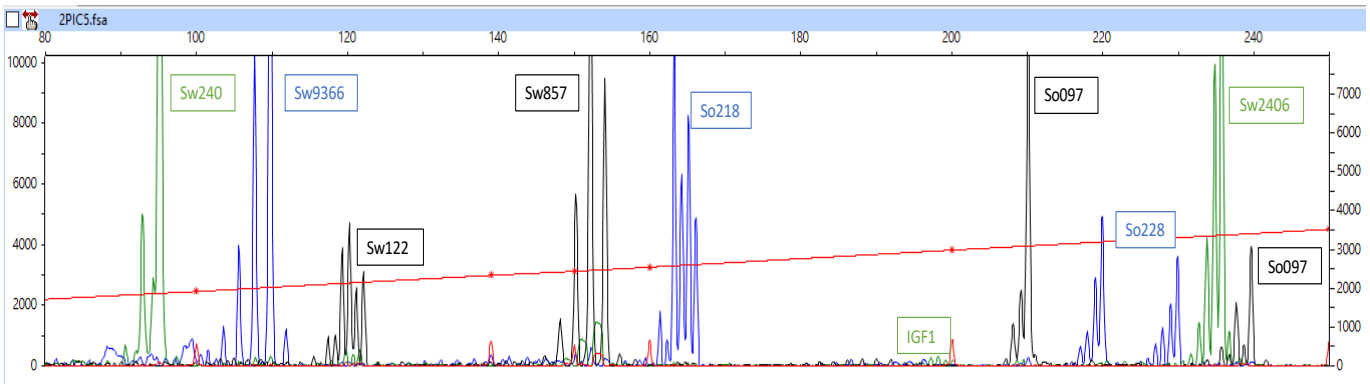
Genescan analize druge združene reakcije veliki jorkšir



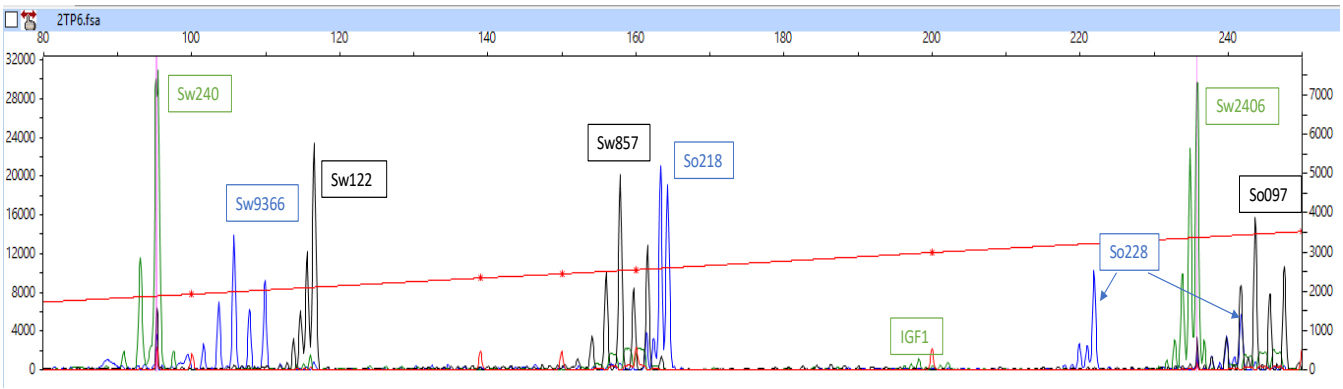
Genescan analize druge združene reakcije landras



Genescan analize druge združene reakcije pietrain

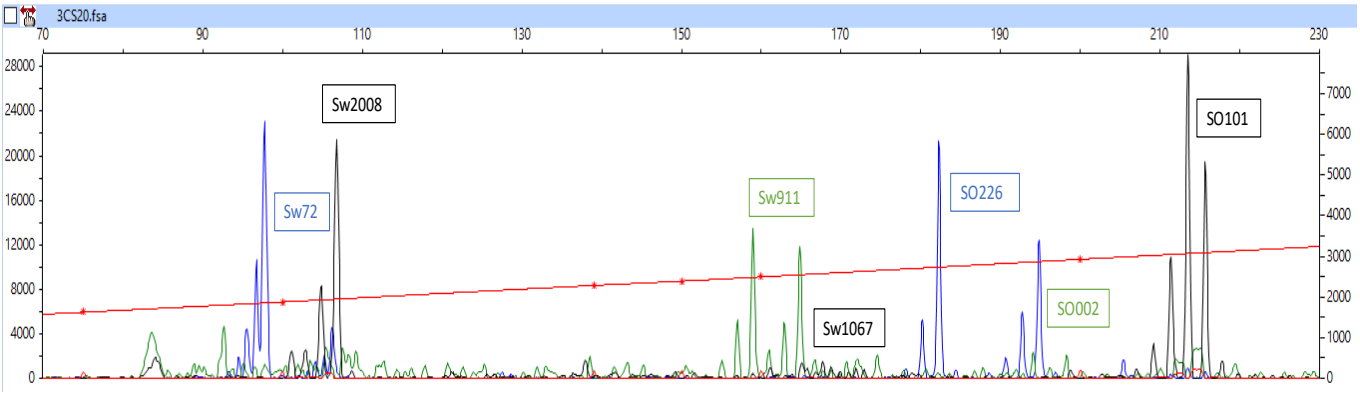


Genescan analize druge združene reakcije PIC

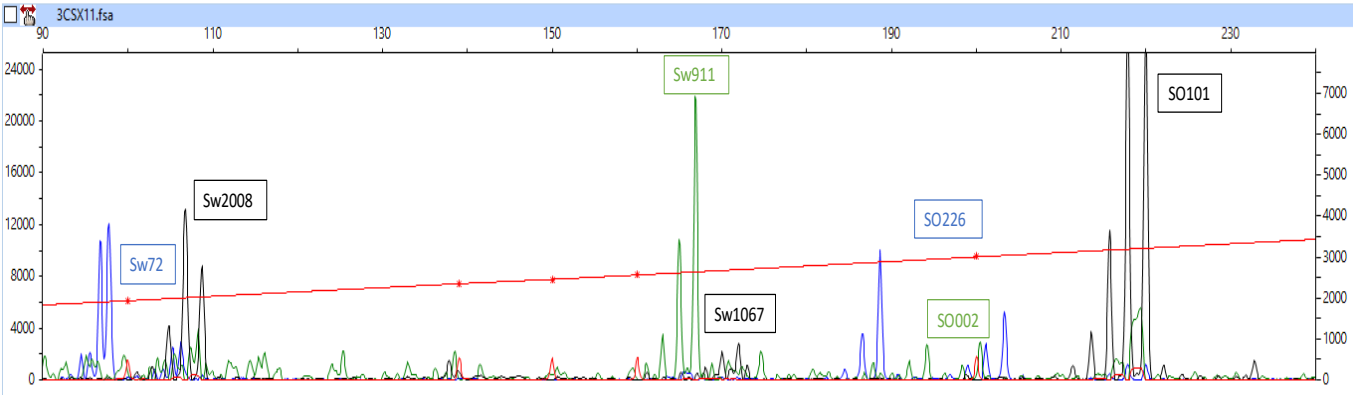


Genescan analize druge združene reakcije topigs

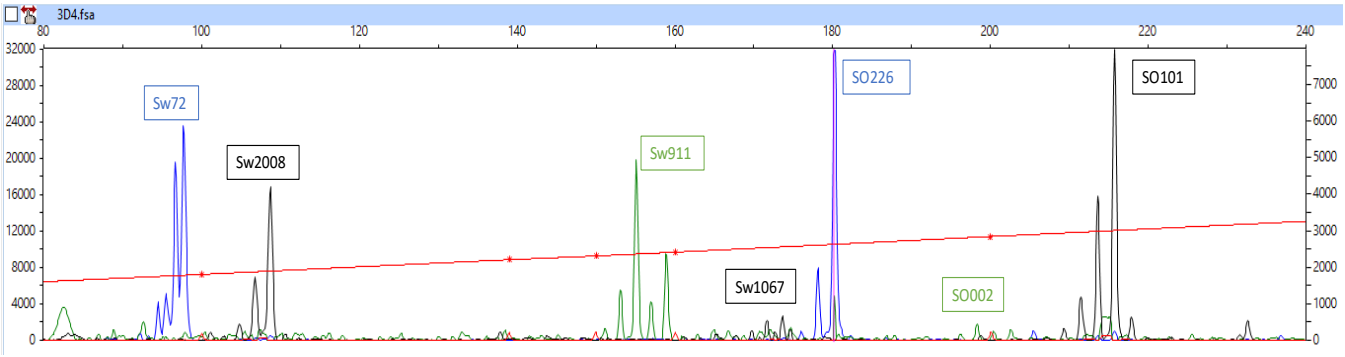
Optimizacija treće združene reakcije



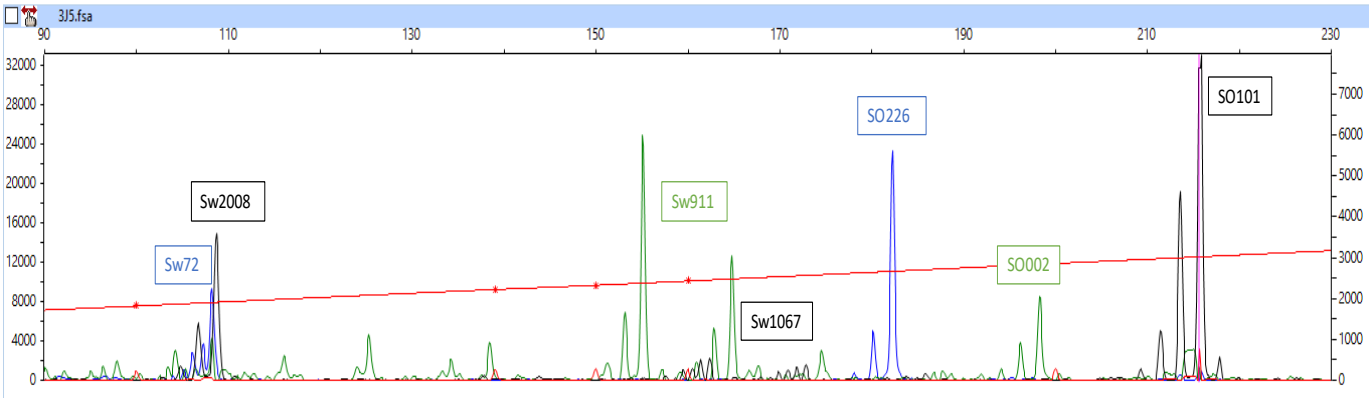
Genescan analize treće združene reakcije crna slavonska



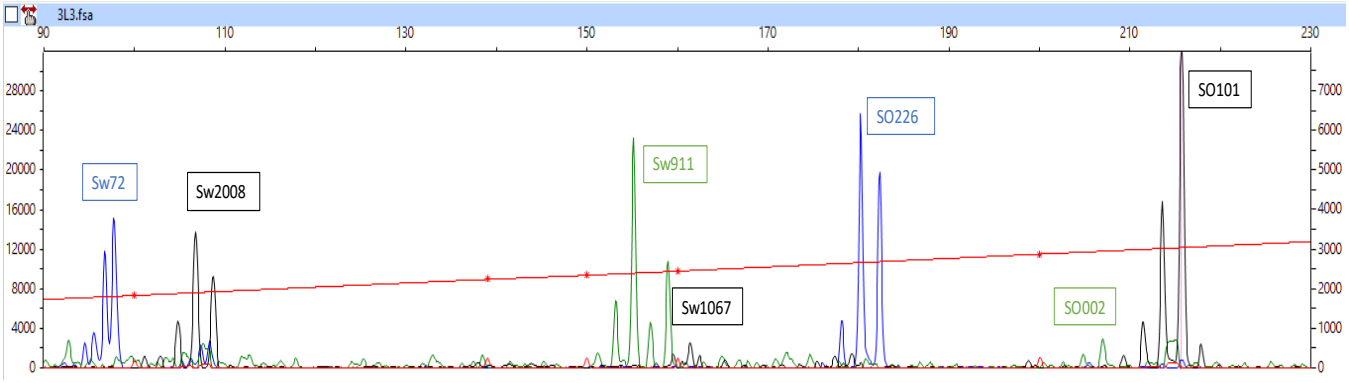
Genescan analize treće združene reakcije crna slavonska (križanac po boji)



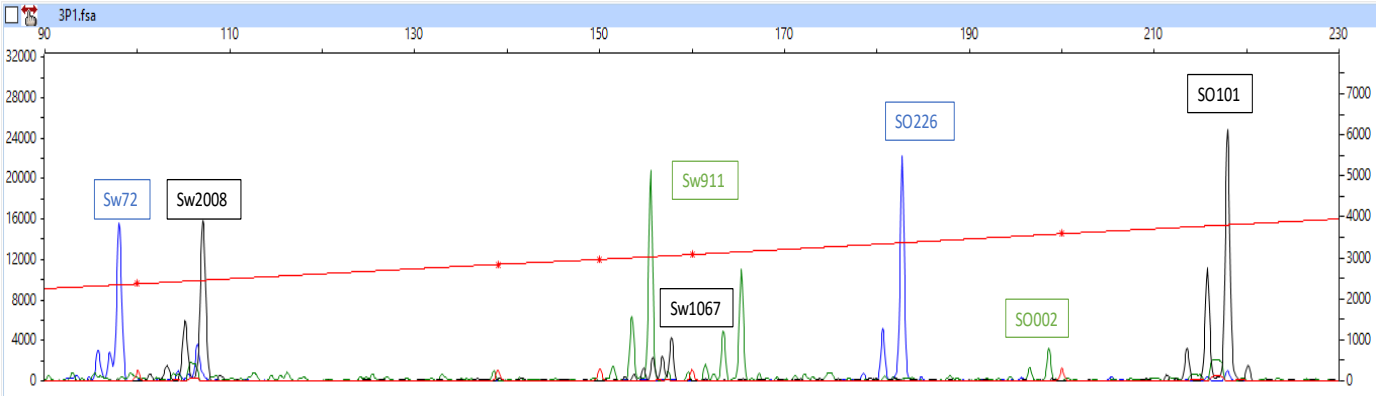
Genescan analize treće združene reakcije – durok



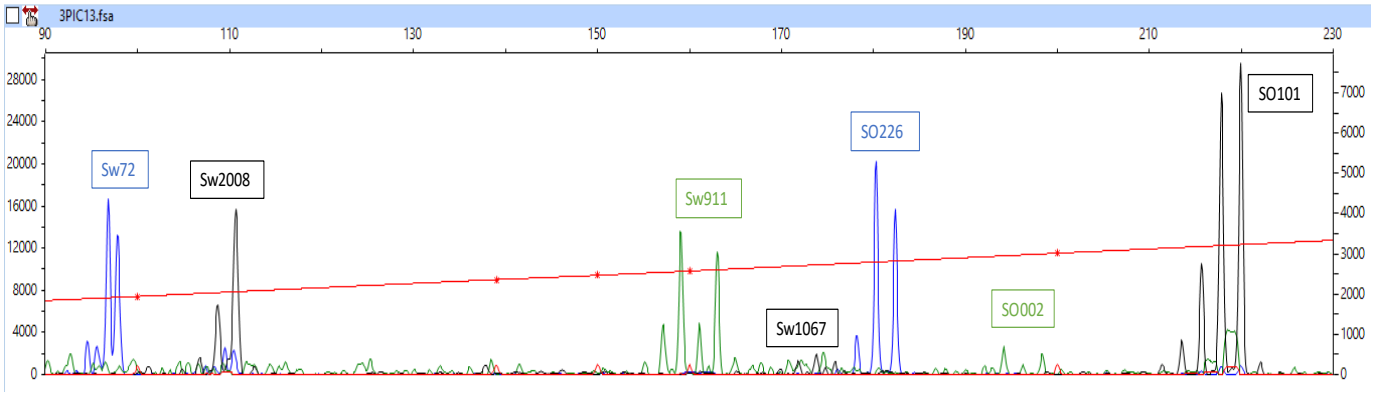
Genescan analize treće združene reakcije veliki jorkšir



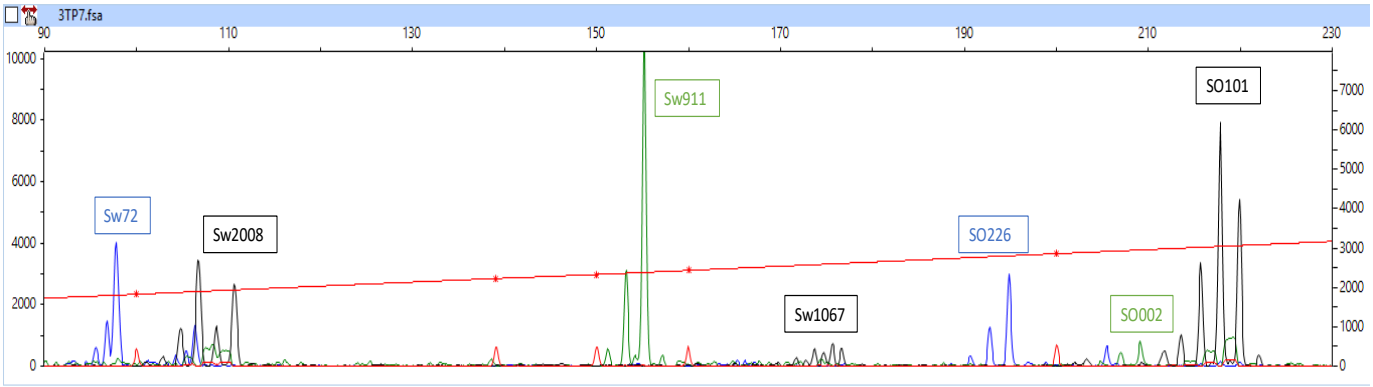
Genescan analize treće združene reakcije landras



Genescan analize treće združene reakcije pietrain



Genescan analize treće združene reakcije PIC



Genescan analize treće združene reakcije topigs

ŽIVOTOPIS

Kristina Gvozdanović (rođ. Budimir), mag.ing.agr., rođena je 06.02.1987. godine u Osijeku. Preddiplomski studij poljoprivrede u Osijeku, smjer Zootehnika, upisuje tijekom 2006. godine, te isti završava tijekom 2009. godine. Diplomski studij poljoprivrede, smjer Specijalna zootehnika upisuje 2009. godine. Diplomirala je 2011. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku i stekla zvanje magistra inženjera poljoprivrede, smjera specijalne zootehnike. Tijekom 2011. godine upisuje diplomski studij „Lovstvo i pčelarstvo“ te tijekom 2013. godine stječe diplomu i zvanje magistra inženjera poljoprivrede, smjera lovstvo i pčelarstvo. Tijekom studija je bila dobitnica stipendije Ministarstva znanosti u kategoriji 10 % najuspješnijih studenata. Dobitnica je nagrada: 2008. godine Lions club nagrada za jednu od najuspješnijih studentica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera; 2009. godine Rektorova nagrada za izniman uspjeh na studiju; 2010. godine Priznanje Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku povodom proslave 50. obljetnice utemeljenja i rada za najuspješniju studenticu Poljoprivrednog fakulteta generacije 2006./2007. akademske godine.

Na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku zapošljava se 2012. godine kao znanstveni novak-asistent na Katedri za Opću i specijalnu zootehniku Zavoda za Specijalnu zootehniku. Poslijediplomski doktorski studij „Poljoprivredne znanosti“ smjer „Stočarstvo“ na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku upisala je školske 2012./2013. godine. U nastavi sudjeluje na izvođenju vježbi modula „Svinjogojstvo 1“ preddipolomskog studija Zootehnike, te „Biološki i zootehnički principi u svinjogojstvu“ diplomskog studija Specijalne Zootehnike. Kao polaznica poslijediplomskog studija sudjelovala je na dva inozemna stručna seminara u organizaciji „European Science Foundation“te „International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology“ te na dva domaća seminara. U sklopu stručnom usavršavana je boravila na Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Department of Agricultural and Food Sciences. Bila je suradnik-istraživač na nekoliko domaćih projekata: „Specifičnosti rasta svinja i peradi i kakvoća proizvoda“, voditeljice prof.dr.sc.dr.h.c. Gordana Kralik; „Primjena molekularne genetike u poboljšanju uzgoja crne slavonske svinje“, voditelja doc.dr.sc. Vladimir Margeta.

Trenutno sudjeluje kao suradnik istraživač na dva domaća projekta: Projekt Hrvatske zaklade za znanost: „Znanstveno brendiranje svinjskog mesa (Scientifically Branded Pork), voditelja prof.dr.sc. Goran Kušec; VIP projekt Ministarstva poljoprivrede „Razvoj poljoprivrednih sustava i standardizacija kvalitete mesa crne slavonske svinje“, voditelja

doc.dr.sc. Vladimir Margeta te na dva međunarodna projekta: OBZOR 2020: Diversity of Local Pig Breeds and Production Systems for High Quality Traditional Products and Sustainable Pork Chains – TREASURE, voditelj prof.dr.sc. Meta Čandek Potokar; CASTRUM - "Pig castration: methods of anaesthesia and analgesia for all pigs and other alternatives for pigs used in traditional products", voditelj prof.dr.sc. Luca Fontanesi.

Kristina Gvozdanović, mag.ing.agr. do sada je usmeno prezentirala na tri međunarodna simpozija (Animal Science Days 2013, Animal Science Days 2014, Simpozij agronoma 2014.) te na tri domaća skupa (Poljoprivreda u funkciji zaštite okoliša 2013., 2014; Okolišno prihvatljiva proizvodnja kvalitetne i sigurne hrane, 2013.). U obliku postera imala je izlaganja na 5 međunarodnih skupova (Krmiva 2012, Animal Science Days 2013, Animal Science Days 2014, Simpozij agronoma 2014., VIII. Mediterranean Pig Symposium 2013, IX. Mediterranean Pig Symposium 2016) te na 7 domaćih skupova (KRMIVA 2012., 2013., 2014.; Poljoprivreda u funkciji zaštite okoliša, 2013.; Okolišno prihvatljiva proizvodnja kvalitetne i sigurne hrane, 2012., 2014.; Hranom do zdravlja, 2016.). Do sada je u autorstvu i koautorstvu objavila 34 znanstvenih i stručnih radova, 5 sažetaka objavljenih u zbornicima radova s domaćeg znanstvenog skupa te 7 sažetaka objavljenih u zbornicima radova s međunarodnih skupova. Aktivno se služi engleskim jezikom te pasivno njemačkim jezikom.
Majka je jednog djeteta.