

# Genomska procjena populacijske strukture i genetske različitosti u konja

---

Zirn, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:*

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:825090>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-02**



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](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Kristina Zirn

Sveučilišni diplomski studij Zootecnika

Smjer Specijalna zootecnika

**GENOMSKA PROCJENA POPULACIJSKE STRUKTURE I  
GENETSKE RAZLIČITOSTI U KONJA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Kristina Zirn

Sveučilišni diplomski studij Zootehnika

Smjer Specijalna zootehnika

**GENOMSKA PROCJENA POPULACIJSKE STRUKTURE I  
GENETSKE RAZLIČITOSTI U KONJA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK**

Kristina Zirn

Sveučilišni diplomski studij Zootehnika

Smjer Specijalna zootehnika

**GENOMSKA PROCJENA POPULACIJSKE STRUKTURE I  
GENETSKE RAZLIČITOSTI U KONJA**

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Goran Kušec, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivona Djurkin Kušec, mentor
3. doc. dr. sc. Maja Gregić, član

**Osijek, 2021.**

## **ZAHVALA**

*Osobito se zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ivoni Djurkin Kušec na prihvaćanju mentorstva za moj diplomski rad! Puno ste mi pomogli prilikom odabira teme te u pronalasku odgovarajuće literature i korigiranju rada. Profesorice, veliko Hvala od srca na suradnji!*

*Asistentici doc. dr. sc. Maji Gregić zahvaljujem na nesebičnoj suradnji tijekom cijelog mog studiranja te na svakoj pomoći prilikom izrada svih mojih seminara i radova. Veliko Hvala!*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, mami, tati i sestri, te pravim prijateljima koji su ovaj trenutak, ovaj dan, i ovu diplomu, jedva dočekali zajedno samnom! Neizmjereno vam Hvala na ogromnoj količini strpljenja, velikoj podršci, i nagovoru da idem dalje!*

*Svom jedinom najiskrenijem prijatelju i najposebnijoj osobi u mom životu zahvaljujem na najvećoj podršci i potpori ovih godina! Hvala ti što si bio uz mene i vjerovao u mene kada sam i sama posustajala! Hvala ti što mi nisi dao da odustanem! Vrijedilo je!*

*Bez vas ne bih bila tu gdje sam danas!*

*Hvala!*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Procjena populacija i genetske različitosti.....	2
1.2. Načini procjene populacijske strukture .....	3
1.3. Principi očuvanja pasmina, konzervacijski programi.....	5
1.3.1. Mjere <i>in situ</i> očuvanja.....	8
1.3.2. Mjere <i>ex situ</i> očuvanja .....	8
2. GENOMSKI MARKERI .....	10
2.1. Mikrosateliti.....	11
2.1.1. Primjeri primjene mikrosatelita na populacijama konja .....	12
2.2. SNP čipovi visoke gustoće .....	13
2.2.1. Primjeri primjene SNP-ova na populacijama konja.....	15
2.3. Sekvenciranje.....	16
2.3.1. Primjeri primjene sekvenciranja cijeloga genoma na populacijama konja.....	16
3. PARAMETRI PROCJENE STRUKTURE POPULACIJE.....	18
3.1. Procjena efektivne veličine populacije - <i>N<sub>e</sub></i> .....	18
3.2. Procjena genomskog inbridinga ( <i>F<sub>ROH</sub></i> ) .....	20
3.3. ADMIXTURE – križanja s drugim pasminama .....	23
3.4. DNA sekvence ROH .....	25
3.5. Signali selekcije (selection sweep signatures).....	27
4. ZAKLJUČAK .....	29
5. POPIS LITERATURE .....	30
6. SAŽETAK.....	34
7. SUMMARY .....	35
8. POPIS TABLICA.....	36
9. POPIS SLIKA .....	37
10. POPIS GRAFIKONA .....	38
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

Današnje visokoproizvodne pasmine domaćih životinja rezultat su sustavnog selekcijskog rada više tisuća godina. Njihovom širenju pogodovali su razvoj moderne tehnologije, tržišna potražnja te industrijalizacija proizvodnje, a većinom na štetu velikog broja pasmina niskih proizvodnih osobina, izvornih pasmina. Nažalost iz tog razloga danas imamo i pasmine koje su pred izumiranjem jer se sve manje uzgajaju, a nositelji su jedinstvenih gena vrijednih očuvanja.

Uzgojni rad se prije temeljio isključivo na uporabi metoda kvantitativne genetike pri čemu su proizvodna obilježja populacije predstavljala glavnu bit selekcije. No, zbog brzog razvoja molekularne genetike omogućen nam je precizan uvid u strukturu i funkciju gena, a genomski markeri postaju glavno oruđe u genomskoj selekciji. Prednosti genomske selekcije se očituju s jedne strane u bržem unapređenju određenih proizvodnih svojstava (biranje uzgojno pogodnih jedinki u ranoj životnoj dobi), a s druge strane učinkovito otkrivanje nasljednih bolesti i eliminiranje štetnih gena u uzgoju. Uz te prednosti, genomska selekcija nam može pomoći još u procjeni populacija i njihove genetske različitosti, prilikom kontrole uzgoja u srodstvu i pouzdanijoj provjeri rodovničkih zapisa. Što doprinosi očuvanju i uporabi izvornih pasmina domaćih životinja u poljoprivredi te zaštiti njihovih genetskih resursa na globalnoj razini.

Cilj ovog rada je prikazati načine kojima je moguće utvrditi populacijsku strukturu i genetsku različitost uporabom markera visoke razlučivosti s posebnim osvrtom na njihovu primjenu u konja.

## 1.1. Procjena populacija i genetske različitosti

Sa stajališta zootehnike, Jovanovac (2005.) definira populaciju kao određenu skupinu životinja (iste vrste ili iste pasmine) koja u zajedničkom okolišu ima specifičnu nasljednu osnovu te reproduktivnu sposobnost, čime osigurava svoje neprekidno postojanje, a upravo se po tome razlikuje od drugih populacija. To nadalje znači da se populacije međusobno razlikuju po svojoj varijabilnosti (sličnosti ili različitosti).

Geni svih jedinki u populaciji predstavljaju njenu nasljednu osnovu. Kako se geni prenose sa roditelja na potomstvo, stvara se kontinuitet populacije. No, nisu genotipovi svih generacija isti: oni ovise o genima roditelja. Na neke genotipove utječe sam čovjek, uzgajivač koji odabire roditelje budućih generacija, no osim njega na učestalost gena uz selekciju utječu i mutacije i migracije u genomu. Prema tome, populacije se međusobno razlikuju i po svojoj genetskoj strukturi, odnosno po učestalosti (zastupljenosti) gena i genotipova. Današnja procjena populacija, pa i sama genomska selekcija, odvijaju se uz pomoć znanstvenih disciplina i grana genetike, populacijske genetike te genomike. Područja kojima se bavi populacijska genetika su: utjecaj sistematskih i slučajnih procesa na promjene u frekvenciji gena i genotipova, srodnost između životinja i uzgoj u srodstvu, varijabilnost i nasljeđivanje kvantitativnih svojstava te utvrđivanje osnovnih populacijskih pokazatelja koji su važni u selekciji i uzgoju (Jovanovac, 2012.).

Zhang i sur. (2018.) iznose kako se genetska raznolikost kod domaćih životinja mijenja kroz selektivne procese u populacijama. Dalje ističe da snažan odabir poželjnih alela u selekciji (seleksijski pritisak) često rezultira smanjenjem genetskih varijacija u lokalnoj regiji genoma. Ovisno o intezitetu selekcije, smanjuje se i genetska varijabilnost te povećava inbriding (Prochinak i sur., 2021.), što je tijekom vremena rezultiralo homogenošću unutar pasmina te gubitkom genetske raznolikosti (Gregić i sur., 2019.).

Razvoj molekularne genetike i korištenje genomskih markera omogućio je precizan uvid u genetsku strukturu populacije i istraživanje pojedinačnih odnosa unutar i među pasminama neke populacije (Zhang i sur., 2018., Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025.). Tijekom posljednjih 100-tinjak godina uzgojne tvrtke su se koristile znanošću genetike kako bi jasnije shvatile nasljeđivanje svojstava i razvijale sofisticirane sheme uzgoja kako bi poboljšali učinkovitost i stopu rasta proizvodnje, reprodukciju i zdravlje svojih životinja (Rotschild, 2017.). Ivanković



(2005.) ističe da se markerski sustavi u genomskoj selekciji konstantno razvijaju čime se otvaraju nove mogućnosti primjene genomskih markera u kontroli i selekciji domaćih životinja.

U posljednjem desetljeću napredak tehnologije i bioinformatike omogućio je provedbu genomske selekcije kod konja za procjenu UV (uzgojne vrijednosti) jedinke u smislu genetskog poboljšanja te smanjenju generacijskog intervala u programima uzgoja konja (Potočnik, 2018., Gregić i sur., 2019., Ivanković i Ramljak, 2020.). Petersen i sur. (2013.) su izjavili da su takvi intenzivni selekcijski postupci doveli do homogenosti unutar pasmina konja te gubitka genetske raznolikosti iako su ranija istraživanja pokazala značajne udjele raznolikosti u majčinim lozama u vrijeme pripitomljavanja konja. Stoga će i kod uzgoja konja u budućnosti također biti potrebno koristiti podatke cijelog genoma za upravljanje genetskom raznolikošću i križanjima u srodstvu.

## **1.2. Načini procjene populacijske strukture**

Selekcija je najznačajniji čimbenik koji dovodi do promjene učestalosti gena u nekoj populaciji u cilju povećanja genotipova s poželjnim svojstvima. Njenim metodama utječemo na genetsku varijabilnost jer načinima odabira životinja prema fenotipskoj sličnosti ili genetskoj srodnosti (inbriding), a ovisno o ciljevima uzgoja pasmine, pojačavamo svojstva od interesa (npr. visoka proizvodnost pasmina). Uzgoj u srodstvu ili inbriding je odabir i parenje jedinki koje su usko povezane, odnosno imaju jednoga ili više zajedničkih predaka (Jovanovac, 2005., Čačić, 2011.). Stupanj srodstva ovisi o veličini populacije koju predstavlja ukupan broj jedinki u populaciji koji aktivno sudjeluje u reprodukciji. Općenito vrijedi: što je manja populacija, to je manja udaljenost između zajedničkih predaka. Šantek (2016.) navodi da se uzgojem u srodstvu, iako utječemo na poželjno svojstvo, može negativno utjecati na smanjenje genetske vrijednosti za svojstva fitnessa (zdravlje, otpornost, plodnost, životni vijek). Dakle, viša razina inbridinga donosi i veće šanse za ispoljavanje homozigotnih recesivnih štetnih alela, što za posljedicu može imati smanjenje kondicije jedinke i pogoršava plodnost (Polak i sur., 2021.).

Mjera uzgoja u srodstvu je koeficijent inbridinga, a pokazuje nam kolika je vjerojatnost da su dva gena identična po podrijetlu (Jovanovac, 2012.), odnosno da su 2 alela jednog lokusa promatrane jedinke identična po podrijetlu (Čačić, 2011.). Koeficijent inbridinga je vrlo važan parametar kojeg treba uzeti u obzir kao podlogu prilikom planiranja sparivanja budućih

roditelja novih generacija. Do vrijednosti koeficijenta inbridinga može se doći preko pedigreea ili kombiniranom uporabom genomskim markera i pedigreea (Šantek, 2016.). Pedigre ili rodovnica (pedigree) je genealoški zapis o predcima neke jedinke (Jovanovac, 2012.), to jest tabelarna isprava u kojoj su precizno po generacijama poredani predci jedinke, sustavno od roditelja pa prema daljnjim predcima (Čačić, 2011.). Isti autor ističe da je u određivanju genetske varijabilnosti i evolucije populacije analiza pedigreea značajan alat jer sadrži korisne informacije za procjenu inbridinga, populacijsku strukturu prilikom utemeljenja pasmine, generacijski interval, stupanj komplementnosti rodovnika i efektivnu veličinu populacije. Preko pedigreea se može doći do vrijednosti koeficijenta inbridinga na slijedeće načine:

1. analizom putanje („Path Analysis“),
2. preko matrice aditivne srodnosti („Additive Matrix Relationship“), i
3. „Genne Dropping“ (Šantek, 2016.).

Kao važnu prednost genomske selekcije Potočnik (2018.) smatra upravo prevenciju srodnog parenja na osnovu genomske procjene podataka i to upravo zato jer je populacija konja mala u odnosu na druge proizvodne domaće životinje, te zato što se u modernim pasminama konja poznati pastusi prečesto koriste (posebice novim tehnikama umjetne oplodnje, kloniranje). Stoga autor ističe kako će se zbog smanjenja porasta inbridinga u populacijama, buduća sparivanja jedinki morati planirati isključivo na temelju genomske procjene. Iako je primjer populacije kao jedna od najbolje dokumentiranih podataka rodovnice lipicanska pasmina konja (Grilz-Seger i sur., 2019.a), točnost procjene uzgoja u srodstvu ovisi o velikoj preciznosti dokumentacije uzgoja (Polak i sur., 2021). Tako su isti autori uspoređivali rezultate genomske procjene srodstva i procjene srodstva putem genealoških podataka, te su zaključili da su procjene temeljene na genomskim markerima znatno preciznije i manje pristrane. Dakle, upravo zbog toga što postoji mogućnost pogrešaka nepreciznih zapisa i ograničenih podataka o podrijetlu, pri procjeni uzgoja u srodstvu prednost se daje genomskoj Stock i sur. (2016.).

### 1.3. Principi očuvanja pasmina, konzervacijski programi

Razvoj suvremene tehnologije i mehanizacije s jedne strane je omogućio procvat moderne poljoprivredne proizvodnje, no s druge je potisnuo tradicionalne biljne i animalne genetske resurse te doveo do nestajanja poljoprivredne biološke raznolikosti. Poljoprivredna i stočarska bioraznolikost je vrlo važna za funkcioniranje ekosustava, te kao takva podupire prehrambenu sigurnost, koja je jedan od ciljeva *Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih Naroda* (engl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO*) (Barać i sur., 2011.). Animalni genetski resursi (engl. *Animal Genetic Resources – AnGR*) predstavljaju vrlo važnu stavku biološke svjetske prehrambene sigurnosti koja se kontinuirano smanjuje, a potencijal preostale raznolikosti se ne ostvaruje u potpunosti (FAO, 2011.).

Posljednjih nekoliko desetljeća broj pasmina domaćih životinja skroz se smanjuje, neke pasmine su postale ugrožene, a neke su nažalost i izumrle. Gubitak izvornih pasmina se i dalje nastavlja što dovodi do daljnjeg gubitka animalnih genetskih resursa, a samim time i gubitka biološke raznolikosti. Međutim, mnogo je razloga za očuvanjem takvih pasmina. Kako je već ranije spomenuto, izvorne pasmine su nam od iznimne važnosti zbog svojih gena u kojima su akumulirane adaptivne sposobnosti, poput odgovor na klimatske promjene, različite uvjete okoliša, otpornost na bolesti, stres i drugo, gdje korištenje ovakvih genetskih resursa predstavlja odgovor na izazove u budućnosti (Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u RH 2021.-2025.).

Ivanković (2005.) ističe da nam ograničenost bioloških resursa i stupanj ugroženosti pasmina nameće nužnost izbora prioritetnih pasmina koje se trebaju uključiti u konzervacijske programe, a da bi se izradili objektivni kriteriji i smjernice istih, pomoći će istraživanja genetskih profila pasmina, izračuni genetskih distanci i otkrivanje filogenetskih odnosa. Stoga i ovdje u programima očuvanja ugroženih pasmina, molekularno genetske metode imaju važnu ulogu. Procjena ugroženosti pasmine temelji se na više indikatora: numeričkim, geografskim, demografskim, tržišnim, te genetskim (Barać i sur., 2011.).

Prema FAO-u (2006.) stopa uzgoja u srodstvu ( $\Delta F$ ) se zaključuje na temelju izračuna efektivne veličine populacije ( $N_e$ ) iz formule:

$$N_e = \frac{4 \times N_m \times N_f}{N_m + N_f},$$

gdje  $N_m$  predstavlja broj aktivno rasplodnih muških jedinki, a  $N_f$  broj aktivno rasplodnih ženskih jedinki, a na taj način se utvrđuje ugroženost pasmina prema FAO kriterijima.

U FAO kriterije se ubrajaju efektivna veličina populacije ( $N_e$ ), stopa promjene uzgoja u srodstvu ( $\Delta F$ ), koeficijent prosječne srodnosti životinja, genetski doprinosi osnivača i predaka, potpunost podrijetla, genetski konzervacijski indeks, prosječni generacijski intervali i reproduktivne dobi za sva 4 puta roditelj-potomak (Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025.).

S gledišta konzervacijskih programa zaštite i očuvanja najvažnija aktivnost je upravo kategorizacija pasmina u skladu s ugroženosti pasmine. Kategorizacija je usmjerena na 3 čimbenika populacijske genetike:

- oskudnost brojnosti populacije (broj uzgojno valjanih jedinki)
- stopa uzgoja u srodstvu ( $\Delta F$ )
- prisutnost aktivnih programa očuvanja.

U Republici Hrvatskoj je 2010. godine također pokrenuta inicijativa izrade očuvanja animalnih genetskih resursa kroz *Nacionalni program očuvanja izvornih i zaštićenih pasmina domaćih životinja*, pokrenutog sa strane FAO-a, a u tablici 1. vidljive su kategorije statusa ugroženosti pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj s obzirom na efektivnu veličinu populacije.

Tablica 1. Definiranje statusa ugroženosti izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj obzirom na efektivnu veličinu populacije ( $N_e$ ) prema Nacionalnom programu izvornih i zaštićenih pasmina domaćih životinja (izvor: Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025.)

Razred ugroženosti:	$N_e$ :	Opis:
<b>Ia</b> (kritično ugrožena)	$N_e \leq 50$	Kritično ugroženu populaciju treba žurno uključiti u programe pohrane genetskog materijala u Banku gena (spermu, jajne i somatske stanice). Takve populacije su rijetko samoodržive te prema potrebi treba u uzgojni program integrirati srodne populacije kao „noseću komponentu“ genetskog materijala. Ove pasmine treba sačuvati radi kulturološke, tradicijske i genetske vrijednosti.
<b>I</b> (visoko ugrožena)	$N_e > 50$ ; $N_e \leq 200$	Visoko ugroženu populaciju konzervacijske mjere trebaju stabilizirati (efektivnu veličinu, rast udjela uzgoja u srodstvu, populacijski trendovi, gubitak genetske varijabilnosti). Nužno njeno žurno uključivanje u program pohrane genetskog materijala u Banku gena.
<b>II</b> (potencijalno ugrožena)	$N_e > 200$ ; $N_e \leq 1000$	Ugrožena populacija treba biti pod stalnom prismotrom. Potrebno pratiti pokazatelje veličine populacije, trendove u populaciji i razinu genetske varijabilnosti. Poželjno uključivanje populacije u program pohrane genetskog materijala u banku gena.
<b>III</b> (nije ugrožena)	$N_e > 1000$	Populacija treba biti pod nadzorom a populacijski trendovi redovito praćeni i dokumentirani.

U cilju očuvanja izvornih pasmina domaćih životinja postoje sljedeći konzervacijski programi, to jest programi očuvanja kroz koje se provodi zaštita izvornih pasmina domaćih životinja (FAO, 2006.) a to su:

- očuvanje *in situ*
- očuvanje *ex situ*:
  - *ex situ in vivo*
  - *ex situ in vitro*

### 1.3.1. Mjere *in situ* očuvanja

Program očuvanja izvornih pasmina domaćih životinja u *in situ* modelu predstavlja konzerviranje pasmine kroz kontinuirani uzgoj i korištenje u proizvodnom sustavu u kojem je pasmina nastala ili se inače nalazi i uzgaja (Banka gena, FAO, 2006.). U načinu uzgoja preferiraju se ekstenzivni proizvodni sustavi i tradicionalne tehnologije, no dopuštaju se i mala odstupanja uz uvjet da se omogućava djelotvoran selekcijski rad i očuvanje pasmine (Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025.). U programu očuvanja potrebno je praćenje svih onih FAO kriterija za procjenu ugroženosti i uz rodovničke podatke koristiti i SNP-ove za procjenu genomske razine inbridinga ( $F_{ROH}$ ) i efektivne veličine populacije temeljem linkage disequilibriuma (NeLD) (Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025.). Uspješno *in situ* konzerviranje zahtjeva promjenu ekonomskih i tržišnih okruženja uz uvjet da omogućuju pasmini financijsku održivost (Banka gena). Zaštita domaćih životinja se uglavnom provodi kroz ovaj, *in situ* model, u kojem su lokalne pasmine dio agro – ekološkog sustava, gospodarstva i kulture lokalne zajednice. *In situ* očuvanje izvornih pasmina domaćih životinja uključuje identifikaciju, označavanje i registraciju domaćih životinja u matičnim knjigama, provedbu performance i progenog testa, genetsko vrednovanje u uzgojnim programima uz naglasak na očuvanje genetske raznolikosti unutar pasmine, te provedbu specifičnih mjera u očuvanju i zdravstvenoj zaštiti (Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025., FAO, 2011.).

### 1.3.2. Mjere *ex situ* očuvanja

Modeli *ex situ* konzervacije i gospodarske reafirmacije lokalnih pasmina često su zapostavljeni, podcijenjeni i nekoordinirani. Program očuvanja izvornih pasmina domaćih životinja model zaštite *ex situ* predstavlja aktivan pristup zaštite genetskih resursa izvan njihovog izvornog okruženja u dva pristupa:

- *ex situ in vivo* – očuvanje živih jedinki izvornih pasmina izvan njihova uzgojna područja (parkovi prirode, zoološki vrtovi, znanstvene farme, istraživački centri). Konzerviranje pasmine relativnog malog broja jedinki, posebice pasmine koje spadaju u kritično ugrožene

- *ex situ in vitro* – model prikupljanja i čuvanja uzoraka uzgojno valjanih jedinki u tekućem dušiku na  $-196^{\circ}\text{C}$ . Takav način konzerviranja genetskog materijala naziva se kriokonzervacija, te podrazumijeva prikupljanje i čuvanje spolnog i tkivnog staničja u bankama gena domaćih životinja, kako bi se prema potrebi žive životinje mogle u budućnosti rekonstruirati. Genetski resursi se na takav način za očuvanje biomaterijala pohranjuju u specifične ustanove Banke gena čija je glavna uloga praćenje promjena u strukturama populacija izvornih pasmina domaćih životinja te uvođenje novih tehnologija u njihove konzervacijske programe i uzgoje.
- Treći pristup je izrada i provedba nacionalnih i međunarodnih projekata uporabe izvornih pasmina kao sredstvo očuvanja i održavanja staništa – predstavlja aktivnu uporabu izvornih pasmina na tradicionalan način na zaraslim staništima koja su pod mogućom prijetnjom invazivnih biljnih vrsta. (FAO, 2006., Banka gena, Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025.).

## 2. GENOMSKI MARKERI

Uzgoj domaćih životinja se u prošlosti temeljio na mjerenjima fenotipskih svojstava i utvrđivanju njihove varijabilnosti. Kasnije su se u selekciji koristile metode procjene uzgojne vrijednosti (seleksijski indeks, BLUP i druge) s kojima se procjenjivao genotip na osnovu fenotipa. Zatim se uzgojni rad provodio uz uporabu metoda kvantitativne genetike u cilju povećanja proizvodnosti same životinje te ostvarenja ekonomske dobiti (Ivanković, 2005.). Sve do razvoja molekularne genetike koji omogućava nove pristupe u selekciji domaćih životinja.

Posljednja 2-3 desetljeća otkrivanjem mnoštva gena u seleksijski rad uvode se genetske analize životinja, koje koriste genomske markere (biljege) za otkrivanje gena koji utječu na određena svojstva, te određivanje lokusa kvantitativnih svojstava (QTL – *Quantitative Trait Loci*) ili regije genoma koje utječu na kvantitativna svojstva (Jovanovac, 2012., Špehar, 2017.). Brojna istraživanja su dokazala da informacije do kojih se dolazi primjenom genomskih markera mogu uvelike povećati učinak selekcije, skratiti generacijski interval, te smanjiti učestalost nepoželjnih gena koji su uzrok genetskih bolesti.

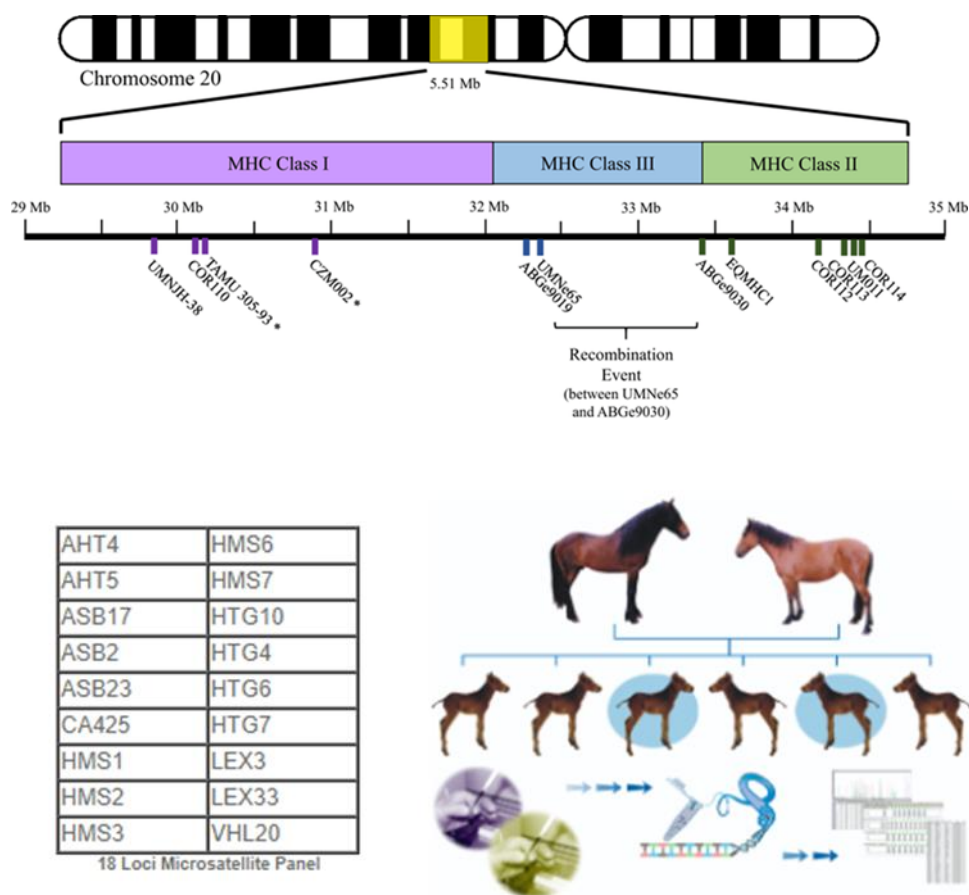
Kada su početkom sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog stoljeća otkrivene tehnike sekvenciranja genoma, započeo je i intenzivan razvoj genomike. Ljudski genom je sekvenciran 2001. godine, a nakon njega uslijedilo je sekvenciranje genoma pileta, krave, svinja, konja, ovaca i koza. Kod konja je sekvenciranje genoma dovelo do napretka u razvoju alata za mapiranje fenotipskih karakteristika i bolesti te procjenu ekspresije gena (Finno i Bannasch, 2014.). Pojava genetski uvjetovanih bolesti kod konja poput x monosomije, himernog kariotipa, hiperkalcemične periodične paralize, smrtonosnog cijepanja patele, narkolepsije, hemofilije, imunološkog defekta, noćnog sljepila, melanoma, i drugih posljedica s nasljednih mutacija i mogu se spriječiti primjenom molekularnih markera u genomskoj selekciji (Gregić i sur., 2019.).

S obzirom na cilj znanstvenog istraživanja populacija danas se rabe različiti markerski sustavi: mikrosateliti, AFLP (*Amplifies Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphism*), mtDNA, Y kromosom, minisateliti i drugi (Ivanković, 2005.).



## 2.1. Mikrosateliti

Mikrosateliti (SSRs, engl. *Simple sequence repeats*) su jednostavne kratke ponavljajuće sekvence sastavljene od nekoliko nukleotida veličine od 2 do 6 baznih parova DNA koji se ponavljaju određenim redoslijedom (npr. CACACACACACA) (FAO, 2006., Finno i sur., 2014.). Rašireni su po cijelom genomu te imaju visok stupanj polimorfnosti i lako se umožavaju (Jovanovac, 2012.). Relativno su mali i mogu se utvrditi relativno jednostavnom PCR tehnikom iz DNA ekstrahirane iz različitih uzoraka tkiva (krv, kosa, koža, čak i izmet) (FAO, 2006.). Mikrosateliti ne kodiraju proteine pa se pretpostavlja da su selektivno neutralni (FAO, 2011.). Sada su dostupni za većinu domaćih životinja u stočarstvu. Njihova je primjena vrlo široka te se danas primjenjuju u identifikaciji životinja, utvrđivanju podrijetla, otkrivanju bolesti, otkrivanju genetskih različitosti između pasmina, u filogenetskim istraživanjima. Zbog visokog stupnja polimorfizma u broju ponavljanja, mikrosateliti se i dan danas upotrebljavaju kao lokacijski markeri pri konstrukciji genomskih mapa za proizvodna i funkcionalna svojstva (Ivanković, 2005., Jovanovac, 2012.). Analiza mikrosatelita daje nam važne informacije glede razumijevanja odnosa međupopulacijske i unutar populacijske genetske različitosti. FAO je dao preporuke za mikrosatelitske lokuse koji će se koristiti za istraživanja genetske različitosti, a koje je razvio ISAG (*Međunarodno društvo za genetiku životinja*, engl. *International Society of Animal Genetics*) savjetodavna skupina za genetsku raznolikost životinja (FAO, 2011.). Mikrosatelitski biljezi koriste se za opisivanje mjera raznolikosti, genetske udaljenosti i strukture populacije. Primjer shematskog hodograma uporabe mikrosatelitskog seta za dokazivanje roditeljstva u konja prikazan je na slici 1.



Slika 1. Hodogram uporabe panela od 18 mikrosatelita (prema preporuci ISAG-a) za dokazivanje roditeljstva (Izvor: <http://www.xeneticafontao.com/eng/pruebalab.php?id=9>)

### 2.1.1. Primjeri primjene mikrosatelita na populacijama konja

Machmoum i sur. (2020.) su u svojoj studiji pokušali definirati odnos između 3 populacije arapske pasmine konja (pustinjska, egipatska i poljska) i provjeriti njihovu genetsku raznolikost uz pomoć 17 mikrosatelita za kontrolu roditeljstva. Svi mikrosateliti su bili informativni, utvrđena je visoka genetska raznolikost unutar te tri populacije. Na temelju dobivenih rezultata zautori su zaključili da te tri populacije imaju visoku razinu protoka gena ili dijele isto podrijetlo, te da imaju visoku razinu koeficijenta inbridinga, što uzrokuje deficit u heterozigotnosti. Autori su naglasili potencijalan rizik od gubitka genetske raznolikosti u istraživanim populacijama konja.

Sadeghi i sur. (2019.) su proučavali genetsku raznolikost između perzijske populacije arapske pasmine konja i autohtonih iranskih pasmina (Caspian, Turkemen, Dareshuri, i

Kurdish). Provjeru roditeljstva i genetsku strukturu populacije su vršili na temelju mikrosatelitskih biljega. Dobivene mjere inbridinga bile su niske, što je ukazivala na visoku genetsku raznolikost u istraživanim populacijama.

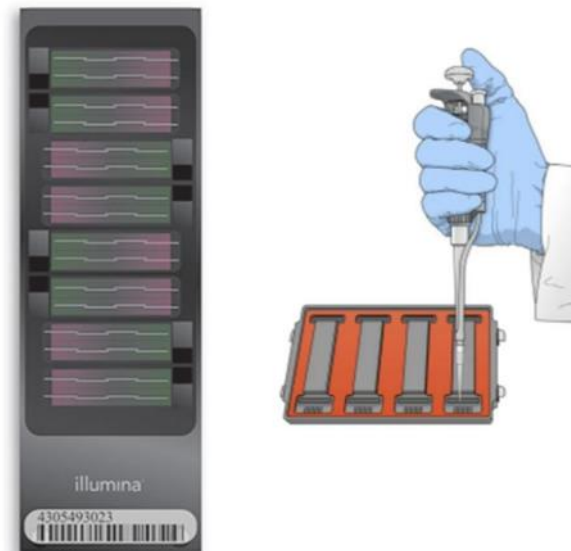
Djori i sur. (2018.) su procjenjivali genetsku varijabilnost i strukturu populacije triju pasmina konja Butanu (Boeta, Sharta, i Yuta) uporabom seta od 29 mikrosatelita. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su izuzetnu genetsku raznolikost tradicionalnih pasmina konja unatoč njihovoj niskoj genetskoj diferencijaciji, gdje je procjena inbridinga (Fis) bila poprilično niska (Boeta 0.023, Sharta 0.001, Yuta 0.021) te je utvrđeno da u niti jedne od analiziranih populacija nije bilo znakova genetskog rasapa.

Khanshour i sur. (2013.) su također proučavali genetsku strukturu populacije arapske pasmine konja uz pomoć mikrosatelitske analize. U istraživanju je korišteno ukupno 15 mikrosatelita: AHT4, AHT5, ASB17, ASB23, HMS6, HMS7, HTG4, VHL20, HMS3, ASB2, HTG10, LEX33, HM S2, HTG6 i HTG7, specifičnih za *Equus caballus*. Autori su zaključili da je genetska raznolikost bila vrlo visoka u populacijama jer su unutar arapske pasmine, sve četiri populacije imale visoke vrijednosti heterozigotnosti: Saudijska (0,68), Sirijska registrirana (0,69), Sirijska neregistrirana (0,75) i Iransko-arapska (0,71).

## 2.2. SNP čipovi visoke gustoće

*Single Nucleotide polymorphism* ili SNP to i jest, polimorfizam pojedinačnih nukleotida i vrlo su česti u genomu te se zbog toga mogu dobiti vrlo točne informacije prilikom procjene genetskih parametara (Šantek, 2016.). Drugim riječima, SNP je varijacija sekvence DNA koja se događa promjenom nukleotida na jednom mjestu unutar genoma jedinke (FAO, 2011.). Budući da su to bialelni markeri, oni imaju nizak sadržaj informacija pa ih se treba koristiti veći broj kako bi se dobile informacije od standardnog panela mikrosatelita koji sadrži oko 30 lokusa. Većina SNP-ova se nalazi u nekodirajućim regijama sekvence gena (intergenetskim) i nemaju izravan utjecaj na fenotip jedinke, a mogu se nalaziti i unutar kodirajućih regija (regulatorne regije gena) pa tako mogu biti povezani u funkciju proteina (FAO, 2006., Jovanovac, 2012.). Postoje genomski **SNP čipovi niske gustoće** (koji sadrže nekoliko stotina

do tisuća SNP-ova) i **SNP čipovi visoke gustoće** (koji sadrže desetke do stotine tisuća SNP-ova).



Slika 2. Ilustracija izgleda SNP mikročipa tvrtke Illumina i aplikacije DNA na isti (Papst, 2019.)

Analize ovakvih genomskih čipova daju velike količine podataka stoga zahtijevaju specijalizirane vještine i dobru bioinformatičku infrastrukturu. Korištenjem SNP nizova visoke gustoće u skeniranju genoma mogu se identificirati i odsječci ROH (engl. *Runs of Homozygosity*) sekvenci (Peripolli i sur., 2016.). SNP mikročipovi se u stočarstvu koriste za utvrđivanje strukturnih varijacija, za otkrivanje i pročišćavanje lokusa povezanih s proizvodnim osobinama, a u konjogojstvu i kako bi se dodatno poboljšalo znanje o genetskoj raznolikosti (Schaefer i sur., 2017). Pronalaženje gena ili regija genoma povezanih s osobinama dovelo je do otkrića gena koji su utjecali na boju dlake, veličinu legla, kvalitetu mesa, uspjeh reprodukcije i zdravstveno stanje životinja (Rotschild, 2017.). Nadalje, razvoj SNP čipova visoke gustoće doveo je i do velikog interesa za izračunom koeficijenta inbridinga iz molekularnih podataka populacije, jer su oni učinkovitiji za procjenu autozigotnosti i za otkrivanje učinaka uzgoja u odnosu na podatke iz rodovnica (Peripolli i sur., 2016.).

### **2.2.1. Primjeri primjene SNP-ova na populacijama konja**

Sadeghi i sur. (2019.) su u svom istraživanju za procjenu genetske raznolikosti osim mikrosatelita koristili i konjski 670k SNP BeadChip kako bi determinirali strukturu populacije autohtonih pasmina konja u Iranu i procijenili genetske odnose između njih. Analiza dobivenih rezultata izvršena je uz pomoć softvera PLINK gdje je učinjena kontrola kvalitete uzoraka, a zatim su procijenjeni genetska raznolikost, analiza strukture populacije, te su filtrirani ROH segmenti uz pomoć kojih je procijenjen koeficijent srodstva. Autori su identificirali signale selekcije u genomskim regijama koje su povezane s imunološkim odgovorom.

Druml i sur. (2018.) su proveli genomsku analizu pasmine konja Haflinger uz pomoć niza BeadChip SNP-ova za utvrđivanje populacijske strukture pasmine. Korištenjem SNP čipa visoke gustoće otkrili su nova saznanja o povijesti uzgoja pasmine Haflinger (poput križanja s drugim pasminama).

Rotschild (2017.) navodi da je analizom SNP-ova u konja determiniran mehanizam i nasljeđivanje više od 20 bolesti (poput patuljastog rasta, sindroma imunodeficijencije ždrijebeta, periodične paralize hiperkalcemije). Nadalje, otkriveni se markeri za gene povezane s bojom dlake, te otkrivanje trkaćih osobina (performance za različite udaljenosti i hodove), otkriven je gen DMRT3 koji utječe na hod kod zaprežnih konja, te gen miostatina („gen brzine“) koji je povezan sa sprinterskim sposobnostima posebice kod pasmine engleskog punokrvnjaka.

Stock i sur. (2016.) navode primjene SNP-a visoke gustoće u pasmini Thoroughbred (engleski punokrvnjak) gdje je potvrđeno da gen za miostatin djeluje na diskriminaciju galopa na kratke i velike udaljenosti.

Korištenjem EquineSNP50 BeadChip-a McCue i sur. (2012.) su genotipizirali jedinke koje su evolucijski povezani s domaćim konjem. Istaknuli su primjenu genotipiziranja u mapiranju osobina kao glavnu primjenu ove tehnologije. Tako su mapirani lokusi za boju dlake u konja, npr. MC1R(kesten), ASIP (crni/dorat), STX17 (sivi), i mnogi drugi.

## 2.3. Sekvenciranje

Sekvenciranje je tehnologija uz pomoću koje se određuje točan slijed dušičnih baza (A, T, G, C) na odsječku DNA (Jovanovac, 2012.). Intenzivan razvoj molekularne genetike omogućio je pojavu nekoliko naprednih sekvencijskih tehnologija, NGS (engl. *Next Generation Sequencing*) koje se koriste u različitim vrstama aplikacija, a to su:

- sekvenciranje cijeloga genoma (WGS, engl. Whole Genome Sequencing) – analiza cijeloga genoma jedinke;
- sekvenciranje cijeloga egzoma (WEA, engl. Whole Exome Sequencing) – analiza cjelokupnih kodirajućih gena jedinke;
- ciljano sekvenciranje – analiza pojedinog gena ili skupova gena; te
- analiza transkriptoma – analiza sve RNA koju proizvedu određene stanice (D'Agaro, 2016.).

Sve ove metode karakterizira sposobnost sekvenciranja i paralelno masovnog pojačavanja molekula DNA na način klona koje se vrši ponavljanjem nukleotidnih produženih ciklusa ili oligonukleotidnim ligacijama (D'Agaro, 2016.).

### 2.3.1. Primjeri primjene sekvenciranja cijeloga genoma na populacijama konja

Nacionalni je institut za istraživanje humanog genoma (NGGRI, engl. *National Human Genome Research Institute*) za sekvenciranje cijeloga genoma „shotgun“ metodom odabrao konja kao predstavnika reda *Perissodactyla*. Tim projektom je proizveden EquCab2.0 s ukupnom duljinom od 2,43 Gb, od čega je 96% dodijeljeno kromosomima, a predviđena veličina genoma je bila 2,67 Gb (McCue i sur., 2012.). Sekvenciranjem genoma kod pasmine Twiligh otkriveno je 750 000 SNP čipova, a iz ostalih 7 pasmina 400 000 SNP-ova, osiguralo dovoljan broj markera za konstrukciju SNP mikročipova za istraživanje svojstava i nasljednih bolesti.

Finno i sur. (2014.) iznose da je 2011. godine kod kobile pasmine Quater izvršeno sekvenciranje cijelog genoma. Nakon tog procesa otkriveno je 3,1 milijun SNP-ova, te je utvrđeno da genom Quater konja sadrži SNP-ove obogaćene putevima percepcije senzora,

staničnih procesa i transdukciju signala. Osim istraživanja suvremenih pasmina, autori navode nedavno sekvenciranje genoma konja Przelwaskog čiji rezultati nisu otkrili nedavna križanja (admixture) s domaćim konjima, što potvrđuje činjenicu da oni uistinu predstavljaju posljednju preživjelu populaciju divljih konja. Nadalje ističu da su sekvenciranjem otkrivene regije na kromosomu koje sadrže genetske mutacije odgovorne za razne bolesti (sindrom lavande kod ždrijebeta, sindrom imunodeficijencije ždrijebeta, osteohondritis kod punokrvnjaka), za ponavljajuću neuropatiju grkljana, za veličinu tijela, za uveitis konja, za grlenu vrećicu, te za preosjetljivost na ubode od insekata.

### 3. PARAMETRI PROCJENE STRUKTURE POPULACIJE

Struktura populacije se procjenjuje prilikom određivanja genetske varijabilnosti neke pasmine. Kako bi opisali strukturu neke populacije, trebamo procijeniti sljedeće parametre: razinu uzgoja u srodstvu, analizu strukture populacije, analizu signala selekcije (selection sweep signatures) i ROH segmente (Druml i sur., 2018.)

#### 3.1. Procjena efektivne veličine populacije - $N_e$

Jedna od mnogih karakteristika populacija je njena brojnost ili veličina ( $N$ ) i predstavlja osnovni parametar u biologiji. Svaka nova generacija nasljeđuje polovinu gena od oca i polovinu od majke (Jovanovac, 2005., 2012.). Kako bi se populacije s različitom strukturom glede odnosa spolova mogle uspoređivati, uveden je pojam efektivne veličine populacije ( $N_e$ ).

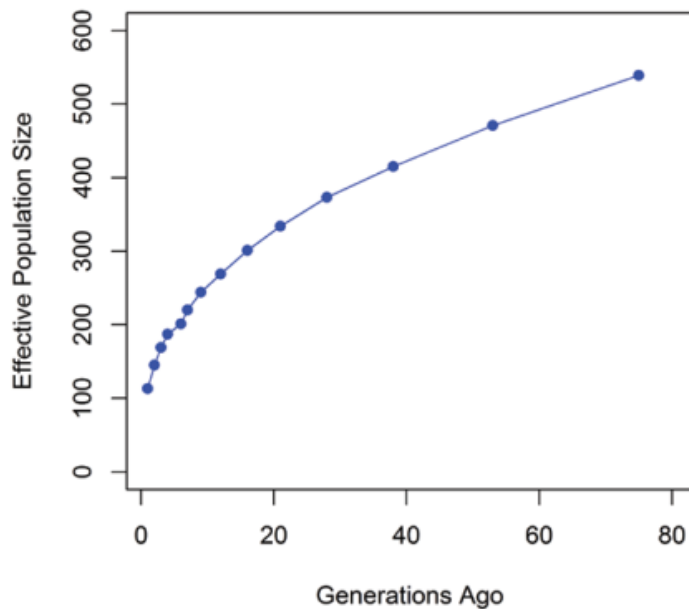
Efektivna veličina populacije (engl. *Effective Population Size* -  $N_e$ ) računa se prema već spomenutoj formuli iz poglavlja 1.3 po metodologiji Falconera, koja je međunarodno priznata od FAO-a u procjenjivanju izvornih pasmina i populacija domaćih i divljih životinja (Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025.). Temelji se na ravnoteži i broju muških i ženskih rasplodnih jedinki u aktualnoj populaciji. Predstavlja relevantan parametar procjene genetske raznolikosti i vrlo je značajna kod povećanja inbridinga u populaciji, jer je ono obrnuto proporcionalno s efektivnom veličinom populacije:

$$N_e = \frac{1}{(2 \times N_e)} \text{ (Jovanovac, 2012.)}$$

Istraživanje karakteristike populacije nekoliko pasmina konja uporabom SNP čipova Petersen i sur. (2013.) utvrdili su da je efektivna veličina populacije bila najmanja kod pasmina Thoroughbred ( $N_e$  od 143 do 190), ali također niska i kod drugih trkaćih pasmina: Clydesdale ( $N_e=194$ ), pasmina Standardbred ( $N_e$  od 179 do 290), Frensch Trotter ( $N_e=233$ ) i drugih, indicirajući da je ove pasmine potrebno pomno pratiti kroz uzgojne i konzervacijske programe. Interesantno, autori su najviše vrijednosti efektivne veličine populacije uočili kod pasmina koje se uzgajaju na području euroazijskog kopna i to: Mongolska ( $N_e=743$ ), Tuva ( $N_e=533$ ), te kod pasmina Islandic ( $N_e=555$ ), Finnhorse ( $N_e=575$ ) i minijaturnih konja ( $N_e=521$ ).



Sadeghi i sur. (2019.) procjenjivali su efektivnu veličinu populacije kod perzijskih arapskih konja i iranskih pasmina konja koristeći 670k SNP BeadChip. Kao što je prikazano na grafikonu 1., efektivna veličina populacije perzijskih arapskih konja s vremenom se smanjivala. Procjenjuje se da je efektivna veličina populacije ( $N_e$ ) prije jedne generacije bila oko 113 jedinki dok je  $N_e$  prije 75 generacija iznosio oko 539 jedinki. Autori dalje navode da je trend opadanja efektivne veličine populacije po generacijama u skladu s umjetnom selekcijom uzgajivača s povećanim fokusom na određene krvne loze i pastuhe u posljednjim generacijama, što može predstavljati opasnost za genetsku raznolikost perzijske arapske populacije, pa ga je potrebno rutinski pregledavati. Ističu još da bi razlog za jako smanjen broj perzijskih arapskih konja prije otprilike 6 generacija mogao biti afrička konjska kuga koja je vrlo smrtonosna bolest kod konja pojavila se u ljeto 1959. u Iranu i uzrokovala smrt mnogih arapskih konj.



Grafikon 1. Prikaz opadanja efektivne veličine populacije perzijskih arapskih konja (izvor: Sadeghi i sur., 2019.)

### 3.2. Procjena genomskog inbridinga ( $F_{ROH}$ )

Koeficijent inbridinga se tradicionalno procjenjuje na temelju podataka iz rodovnica, a nedavni razvoj SNP čipova visoke gustoće doveo je do većeg interesa za izračunom koeficijenta inbridinga iz genomskih podataka. Procjene  $F_{ROH}$ -a mogu otkriti starost inbridinga na temelju duljine ROH segmenata. Koeficijent genomskog inbridinga ( $F_{ROH}$ ) izačunava se prema formuli :

$$F_{ROH} = \frac{\sum L_{ROH}}{L_{AUTO}} \quad (\text{izvor: Druml i sur., 2018.}),$$

gdje je  $L_{AUTO}$  duljina autosomalnog genoma,  $L_{ROH}$  duljina ROH odsječaka, odnosno  $F_{ROH}$  je procijenjen kao zbroj duljine svih ROH po jedinki u ukupnoj duljini genoma (Sadeghi i sur., 2019., Metzger i sur., 2015.)

Znamo da parenje srodnih jedinki rezultira određenim srodstvom potomstva. U zavorenim populacijama, porast inbridinga je neizbježan, a povećanje inbridinga smanjuje genetske varijacije koje mogu dovesti do takozvane „inbriding depresije“ (Polak i sur., 2021.), fenomena koji je povezan s neaditivnim učincima gena (Jovanovac, 2012.). Viša razina inbridinga donosi veće šanse za izražavanje homozigotnih recesivnih štetnih alela, koji se smatraju glavnim uzrokom inbriding depresije, što za posljedicu smanjuje kondiciju životinja i pogoršava plodnost (Polak i sur., 2021.) te smanjuje otpornost i vitalnost uslijed čega dolazi do zastoja u rastu i razvoju, pojave raznih bolesti, poremećaja u reprodukciji i povećanja učestalosti anomalija (Jovanovac, 2012.). Zato je važna točna i pouzdana procjena koeficijenta inbridinga uz pomoć  $F_{ROH}$ -a.

Jedan od primjera posljedice inbriding depresije uz negativne učinke na plodnost i preživljavanje je visoka učestalost zadržavanja posteljice prilikom ždrebljenja kod frizijske pasmine konja. Ovo je jedna od najneplodnijih pasmina konja, a jedino rješenje radi uvođenja nove genetske varijabilnosti je križanje. Isto tako u prosječni životni vijek pripadnika ove pasmine je nizak i iznosi samo 16 godina u odnosu na 25-30 godina, koliki je očekivani životni vijek u drugih pasmina konja. Ovo je posljedica čestih nasljednih bolesti, među kojima su i hidrocefalus te patuljasti rast, koji značajno narušavaju zdravlje i skraćuju životni vijek pripadnika ove pasmine.

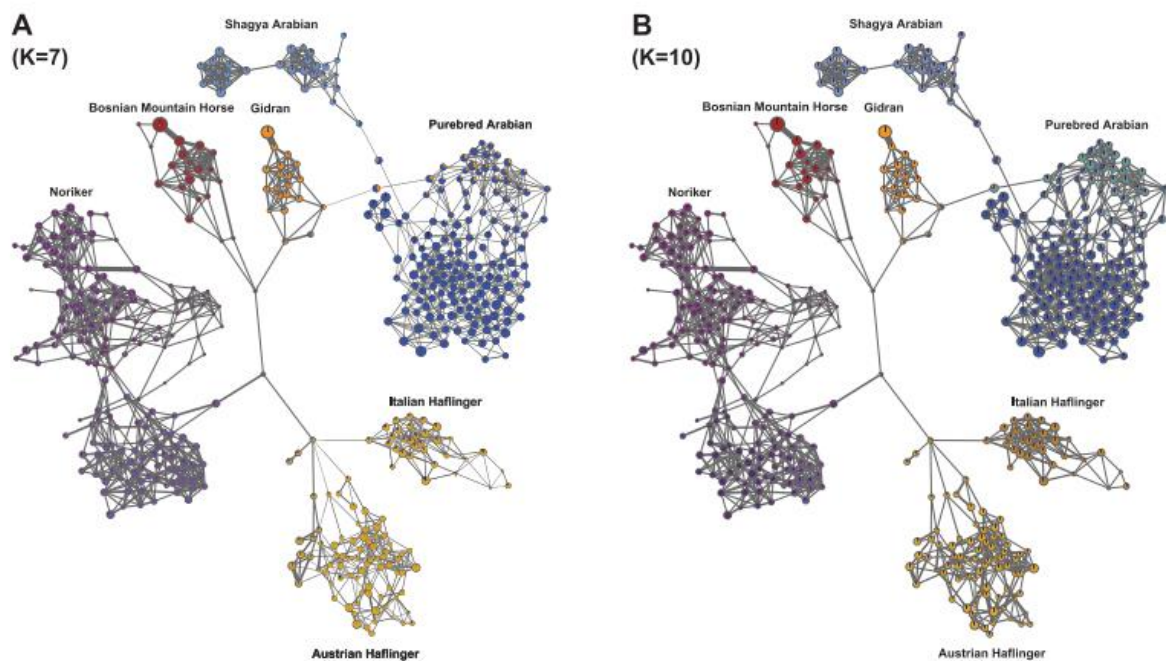
Grilz-Seger i sur. (2019. a) su na temelju različitih klasa duljina segmenata ROH izračunali  $F_{ROH}$  svih subpopulacija lipicanske pasmine konja u Europi (tablica 2.). Otkrili su da je genomsko križanje kako je opisao  $F_{ROH} = 0,13$  bilo niže nego očekivano jer ipak se radi o dugotrajnom uzgoju ergela a na malom popisu populacije. Iz tablice setakođer može uočiti kako je austrijska populacija Lipicanaca imala najmanji broj kratkih ROH odsječaka, dok je njihov najveći broj utvrđen kod mađarske populacije Lipicanaca. Slovačka populacija također je imala vrlo mali broj srednje dugih ROH odsječaka te gotovo i nije imala dugih ROH odsječaka, što ukazuje na vrlo dobro postavljene uzgojne ciljeve i konzervacijski program, gdje nedavnog inbridinga nije ni bilo, što nije slučaj u ostalim subpopulacijama Lipicanaca. Najniži ukupni  $F_{ROH}$  bio je ipak utvrđen u mađarskoj subpopulaciji konja ove pasmine.

Tablica 2. Izračun ROH segmenata i koeficijenta inbridinga  $F_{ROH}$  kod lipicanske pasmine konja (izvor: Grilz-Seger i sur., 2019.a)

Podjela ROH po duljinama:	Austrija	Hrvatska	Mađarska	Slovačka	Svi
0.5-1 Mb	22.7	37.7	41.0	40.0	28.1
1-2 Mb	21.3	31.1	32.1	32.3	24.8
2-4 Mb	23.9	22.2	19.4	21.4	23.1
4-6 Mb	12.9	5.7	5.2	4.8	10.4
6-8 Mb	7.6	2.2	1.2	0.9	5.6
8-10 Mb	4.2	0.4	0.4	0.5	3.0
> 10 Mb	7.4	0.6	0.6	0.0	5.1
$F_{ROH}$ po duljinama:					
0.5-1 Mb	3.5	3.6	3.1	3.7	3.5
1-2 Mb	3.3	3	2.5	3	3.1
2-4 Mb	3.7	2.2	1.5	2	3.1
4-6 Mb	2	0.6	0.4	0.4	1.5
6-8 Mb	1.2	0.2	0.1	0.1	0.8
8-10 Mb	0.6	0	0	0	0.4
> 10 Mb	1.1	0.1	0	0	0.8
$F_{ROH}$ po duljinama (cum.):					
< 1 Mb	3.5	3.6	3.1	3.7	3.5
< 2 Mb	6.7	6.5	5.6	6.6	6.6
< 4 Mb	10.4	8.7	7.1	8.6	9.7
< 6 Mb	12.4	9.3	7.5	9	11.2
< 8 Mb	13.5	9.5	7.6	9.1	12
< 10 Mb	14.2	9.5	7.6	9.1	12.5
$F_{ROH}$ total:	15.3	9.6	7.6	9.1	13.2

### 3.3. ADMIXTURE – križanja s drugim pasminama

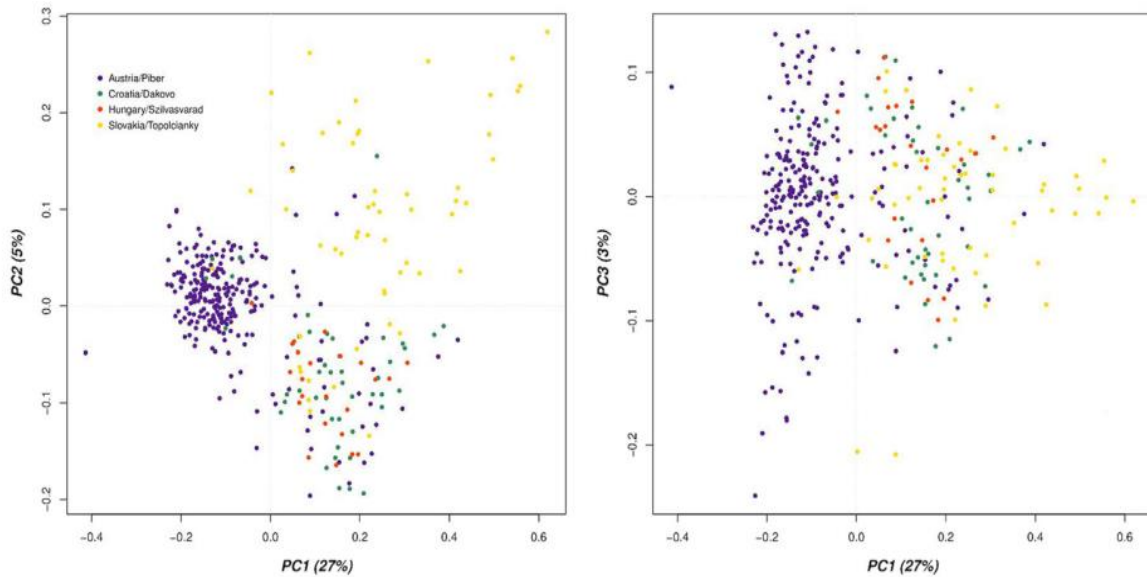
Da bi se utvrdila individualna razina križanja konja, autor Druml i sur. (2018.) proveli su klaster analizu u različitim pasminama konja. Rezultate križanja su vizualizirali te ih integrirali u populacijske mreže visoke razlučivosti. Da bi ilustrirali genetsku povezanost između susjednih konja, debljinu spojnih linija su povezali sa udjelom genetske udaljenosti, tako su deblji rubovi pokazivali male genetske udaljenosti. Nakon toga su skalirali veličinu čvora svakog proučavanog konja na osnovu ukupne veličine duljine ROH pojedinca, a određena boja čvora predstavljala je pojedinačnu razinu križanja na odabranom broju K klastera (slika 3.). Iz dobivene slike vidljivo je kako su se već pri K=7 proučavane populacije međusobno odvojile prema pasminama kojima pripadaju.



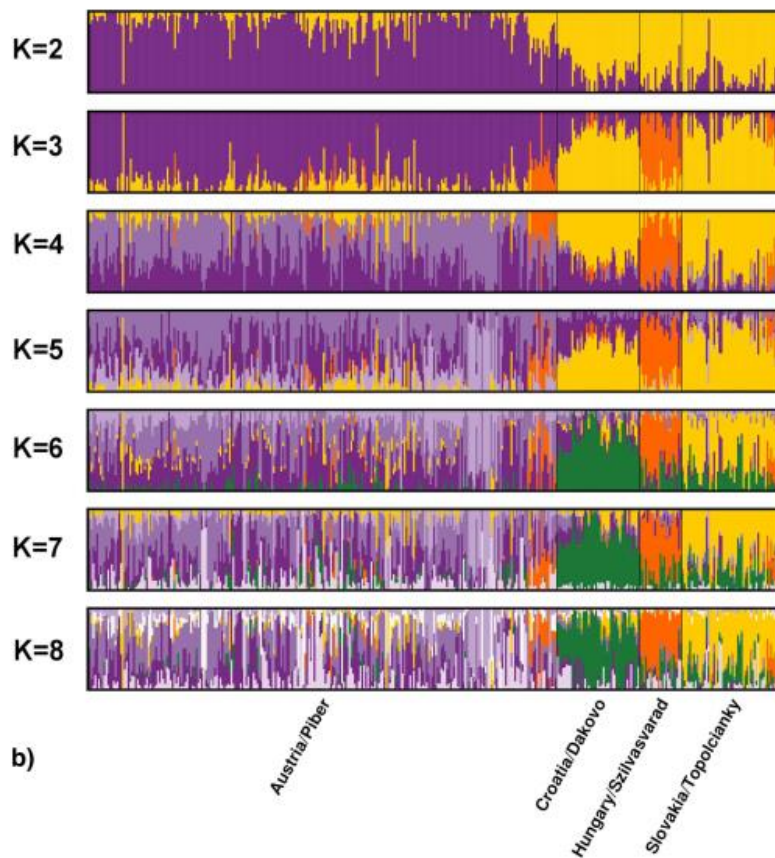
Slika 3. Primjer populacijske mreže visoke razlučivosti u klaster analizi (izvor: Druml i sur., 2018.)

Grilz – Seger i sur. (2019. a) proučavali su razine križanja u lipicanskoj pasmini konja. Prvo su analizom glavnih komponenta (PCA, engl. *Principal Component Analysis*) otkrili da su tri glavne komponente činile 35% ukupne genetske varijacije (grafikon 2.). Na temelju vizualizacije vidljivo je da austrijsku populaciju karakteriziraju niže genetske udaljenosti po parovima i izrazito grupiranje, a da su ostale tri podpopulacije (hrvatska, mađarska i slovačka) međusobno jako povezane, dok podskup austrijskih uzoraka ima sličnosti s hrvatskim, slovačkim i mađarskim konjima. Iz grafikona 3. je vidljivo kako su pri K=2 vidljive dvije populacije Lipicanaca: austrijska i slovačka. Pri K=3 pojavljuje se mađarska populacija

Lipicanaca, u slučaju hrvatske subpopulacije Lipicanaca, kao zaseban genotip ova populacija pojavila tek pri  $K=6$ . Pri  $K=4$  može se uočiti da su se unutar austrijske populacije Lipicanaca pojavile dvije linije, dok je veći broj linija primijećen na  $K=5$ .



Grafikon 2. PCA analiza lipicanskih konja (izvor: Grilz-Seger i sur., (2019. a)



Grafikon 3. Grafički prikaz klastera pojedinačnih populacija za razine križanja (izvor: Grilz-Seger i sur., 2019. a)

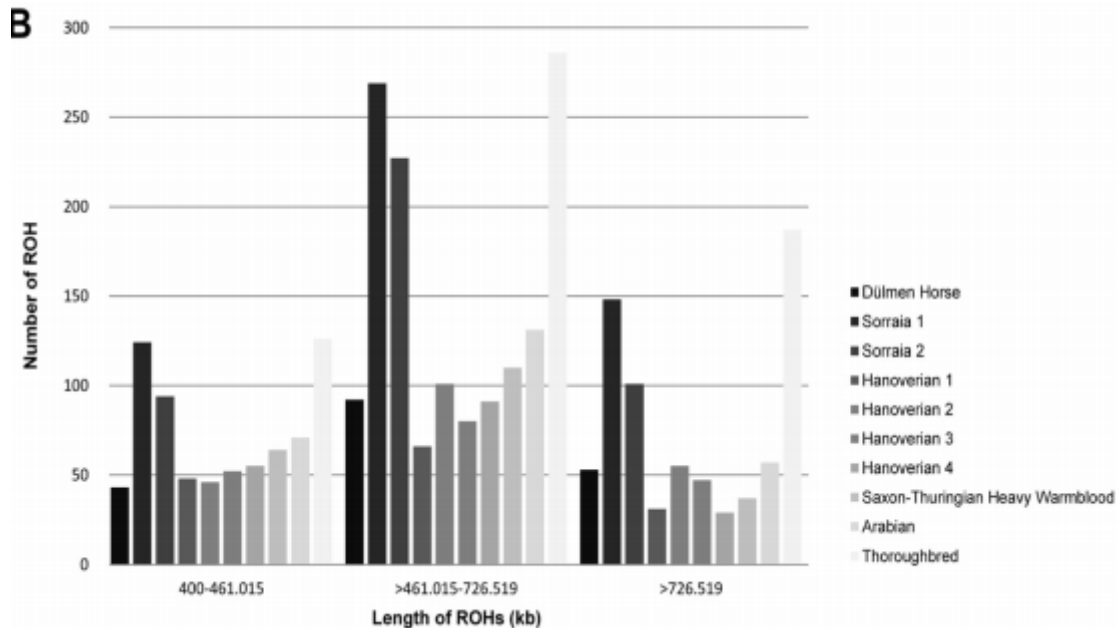
Slično prikazanim modelima Sadeghi i sur. (2019.) su u istraživanju karakteristika populacije perzijskih Arabera STRUCTURE analizom naglasili križanja i njihov međusobni odnos, te ih analizirali i analizom osnovnih komponenti. Structure analiza različitih linija perzijskih arapskih konja rezultirala je formiranjem tri različita klastera, dok su se konji iz drugih linija raspršili preko različitih klastera.

### 3.4. DNA sekvence ROH

ROH (engl. *Runs of Homozygosity*) su kontinuirani homozigotni segmenti raspoređeni po genomu koja proizlaze iz identičnih pojedinačnih haplotipova, a koji prenose zajednički predci (Grilz-Seger i sur., 2019. a, b). Zato predstavljaju odličan alat prilikom procjene uzgoja u srodstvu, pogotovo kada rodovnici nisu dostupni ili se sumnja u njihovu točnost. Sposobnost ROH segmenata je da daju uvid u genetske događaje neke populacije tijekom vremena (Peripolli i sur., 2016.). Duljina ROH i udio genoma koji pokriva ROH dobri su pokazatelji starosti, podrijetla i razine autozigotnosti, a time i križanja u srodstvu (Schiavo i sur., 2019.). Nakon što je Šantek (2016.) usporedila određivanja inbridinga uz pomoć ROH-a s jedne strane i određivanja inbridinga iz rodovnika s druge strane, izrazitu prednost dala je odsječcima ROH jer oni ukazuju i na inbriding bazne populacije. ROH-ovi pružaju korisne informacije o genetskoj povezanosti među jedinkama, minimiziraju stope inbridinga i pomažu u otkrivanju štetnih varijanti u genomu (Peripolli i sur., 2016.).

Segmente ROH dijelimo prema duljini na: kratke, srednje i duge (Ablondi i sur., 2019.). Općenito vrijedi: kratki homozigotni odsječci ukazuju na davni uzgoj u srodstvu, a dugački upućuju na ne tako davni inbriding. Segmenti ROH duljine 2–4 Mb predstavljaju križanje udaljenih generacija predaka (prije 13-25 generacija), što se obično ne može saznati iz rodoslovnih podataka. ROH segmenti srednje duljine (> 8 Mb) predstavljaju udio autozigotnosti porijeklom od predaka rođenih prije 6-7 generacija, a dugi ROH (> 16 Mb) odsječci odražavaju pretke rođene prije 3-4 generacije (Polak i sur., 2021.). Primjer prikaza duljine ROH segmenata pokazan je na grafikonu 4 (Metzger i sur., 2020.) Iz grafikona je vidljiva usporedba broja ROH segmenata raspoređenih prema njihovoj duljini za pasmine: Dülmen, Sorraia (1, 2), Hanoverian (4), Saxon-Thuringian Heavy Warmblood, Arabian, Thoroughbred (Metzger i sur., 2020.). Pasma Dülmen imala je najveći broj kratkih ROH

segmenata (400-461,015 kb), dok je pasmina Sorraia imala najveći broj srednje dugačkih i dugačkih ROH segmenata, što ukazuje na nedavni genski rasap i inbriding u navedene pasmine.



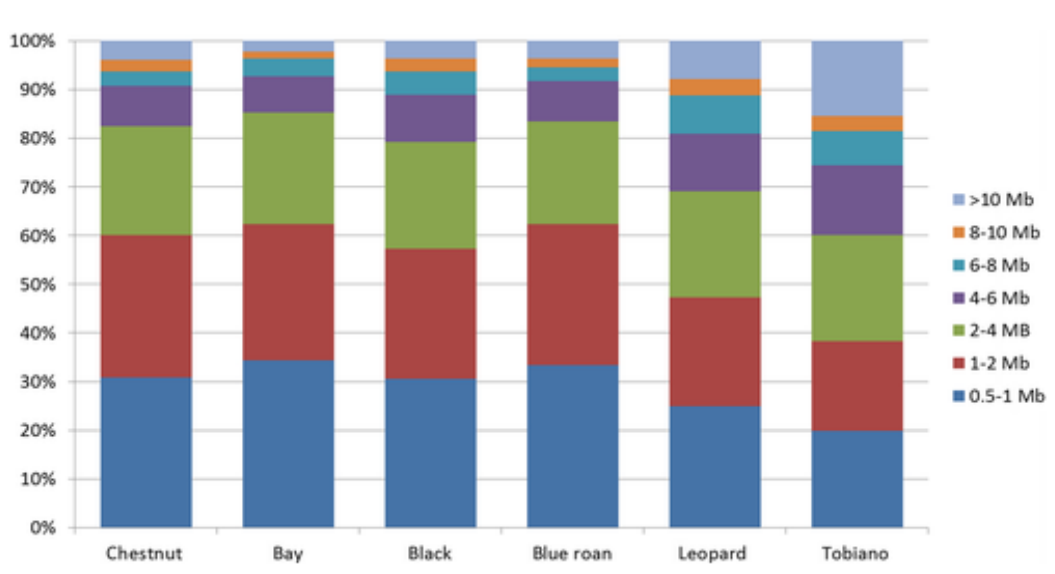
Grafikon 4. Broj ROH segmenata raspoređenim u odabranim pasminama konja prema njihovoj duljini (izvor: Metzger i sur. 2020. )

Grilz-Seger i sur. (2019. a) su skenirali genom kod lipicanaca kako bi otkrili preklapanja ROH segmenata koje dijele više od 50% konja. Analizom su otkrili pet zajedničkih ROH segmenata na ECA11 i ECA4, čime su potvrdili bližu genetsku povezanost između mađarskog i hrvatskog, kao i austrijskog i slovačkog uzorka, a sve subpopulacije dijelile su istu homozigotnu (ROH) regiju na ECA11. Dalje su oko gena STX17 (uzročnik sive boje) otkrili ROH segment koji sadrži gene NR4A3, STX17, ERP44 i INVUS, unutar daljih otoka ECA14, ECA16 i ECA20 otkrili su gene SPRY4, NDFIP1, IMPDH2, HSP90AB1 koji bi mogli igrati važnu ulogu u daljnjim ispitivanjima melanoma konja.

Grilz-Seger i sur. (2019. b) su odabrali populaciju konja Noriker kako bi istražili utjecaj selekcije na veličinu, učestalost, distribuciju i lokalizaciju ROH segmenata u genomu. U analizama kod Noriker pasmine konja otkrili su da je dugoročno parenje jedinki boje kestena i mala efektivna veličina populacije konja s leopardovim pjegastim uzorkom i tobiano konja rezultirala većim srednjim pokrivanjem ROH-a u rasponu od 237,4 do 284,2 Mb, dok je kod zaljevskih (bay), crnih i Roan konja, gdje se obično primjenjuje rotacijsko parenje, bila niža



autozigotnost od 176,4 – 180,0 Mb. Detektirani ROH segmenti sadržavali su određene gene povezane s veličinom tijela (ZFAT, LASP1, LCORL/NCAPG), bojom dlake (MC1R kod kestenastog i PATN1 kod konja s leopardovim pjegastim uzorkom) i morfogenezom (HOXB).



Grafikon 5. Duljine ROH segmenata za lokuse boje kod Noriker pasmine konja (izvor: Grilz-Seger i sur., 2019. b)

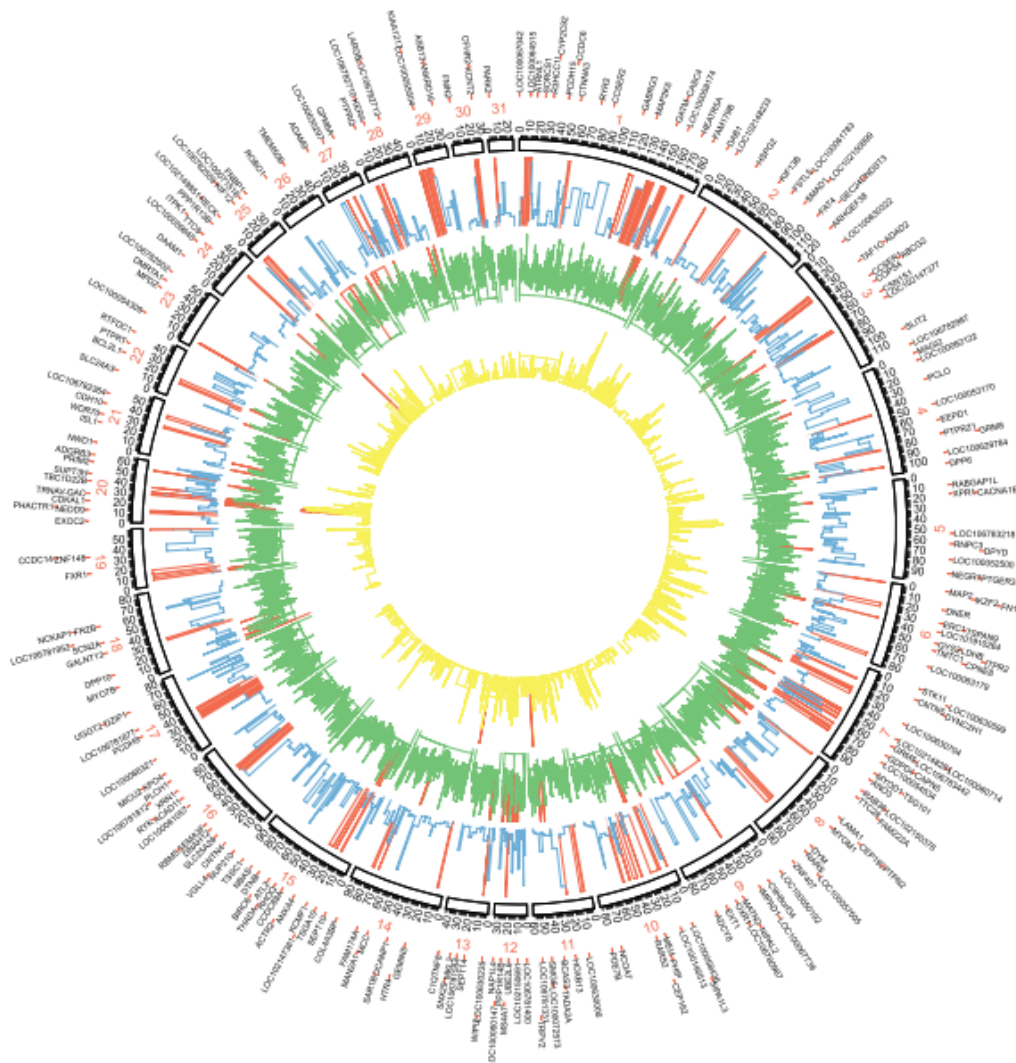
### 3.5. Signali selekcije (selection sweep signatures)

Metzger i sur. (2015.) istraživali signale selekcije koristeći podatke iz polja SNP cijelog genoma na populacijama: Sorraia (2), Dülmen (1), Arabian (1), Saxon-Thuringian Heavy Warmblood (1), Thoroughbred (1) i Hanoverian (4). Autori su pronašli haplotipove u regiji gena boje dlake, veličine i svojstva izvedbe, a najjači signal selekcije su pronašli u pasminama Paint i Quarter na ECA18 u regiji gena za miostatin (MSTN). Unatoč značajnim pasminskim razlikama, sve populacije konja u istraživanjima pokazuju snažne signale selekcije u regiji gena koji utječu na reproduktivnost (Metzger i sur., 2015.). Grilz – Seger i sur. (2019.) tvrde u svojoj studiji da geni zatvoreni na ROH segmentima predstavljaju signale selekcije. Stoga predlažu da prilikom skeniranja genoma treba uzeti u obzir i analizu ROH segmenata radi odabira signala selekcije.

Dva testa diferencijacije populacije (FST i XP-EHH) u istraživanju autora Ablondia i sur. (2019.) otkrila su 8 signala selekcije na ECA1, ECA4 i ECA6 kod pasmine švedskih toplokrvnih konja. Njihova studija je pokazala genomske signale selekcije za morfološke

značajke te za specifičan hod pasmine, a temeljila se na statistici indeksa fiksacije (Fst). Njihova analiza kod švedskih toplokrvnih konja otkrila je signale selekcije koji sadrže gene koji su primarno uključeni u funkciju živčanog sustava, kontrakciju i razvoj mišića, te ponašanje i plodnost.

Zhang i sur. (2018.) su skenirali genomske regije sa CLR (*Composite likelihood ratio*) testom kako bi pronašli signale selekcije u genomu konja. Regije s najvećim CLR-om u genomu konja nalaze se na kromosomu 8 uključujući 9 susjednih prozora od 10 kb. Na slici 5 vidljiv je prikaz globalne distribucije gena, varijanti SNP-ova i potpisa selekcije, te 31 autosom. Krugovi od izvana prema unutra ilustriraju gustoću gena (žuto), SNP gustoću (zeleno) i vrijednosti CLR (plavo). Geni koji se nalaze u regijama sa jakim signalima selekcije predstavljeni su kao ispadanja. CLR označava kompozitni omjer vjerojatnosti; SNP, jednonukleotidni polimorfizam (Zhang i sur., 2018.).



Slika 4. Prikaz globalne distribucije gena, varijanti SNP-ova i potpisa selekcije i 31 autosom kod Noriker pasmine konja(izvor: Zhang i sur., 2018.)

#### **4. ZAKLJUČAK**

Prilikom procjene i vrednovanja genetskih resursa domaćih životinja koriste se molekularno-genetske metode koje nam daju uvid u cjelokupni genom životinje. Tim metodama dobijamo točne i precizne podatke o međusobnom odnosu jedinki unutar neke populacije (prvenstveno razine inbridinga), te međusobnom odnosu subpopulacija neke pasmine životinja i njihove efektivne veličine. Te informacije su nam prvenstveno važne prilikom izvođenja plana sparivanja jedinki za reprodukciju u istoj populaciji, te kod korištenja jedinki za reprodukciju iz drugih subpopulacija (primjer primjena rasplodnih pastuha lipicanaca iz drugih ergela), zbog mogućeg uzgoja u srodstvu.

Cilj modernog uzgoja u konjogojstvu je stvaranje zdravih sportskih konja visokih performansi koji su prikladni za razne discipline i natjecanja, što je povezano s intenzivnom selekcijom koja obično dovodi do smanjenja genetske raznolikosti i posljedičnog povećavanja inbridinga. Stoga bi se trebalo strogo pratiti kako bi se održala genetska varijabilnost te spriječila mogućnost „inbriding depresije“.

## 5. POPIS LITERATURE

1. Ablondi, M., Viklund, A., Lindgren, G., Eriksson, S., Mikko, S. (2019.): Signatures of selection in the genome of Swedish warmblood horses selected for sport performance. *BMC Genomics*, 20: 717.
2. Banka gena domaćih životinja Republike Hrvatske. Ministarstvo poljoprivrede, 2019. (izvor: [https://hpa.mps.hr/wp-content/uploads/2019/01/banka-gena\\_hr\\_eng\\_final.pdf](https://hpa.mps.hr/wp-content/uploads/2019/01/banka-gena_hr_eng_final.pdf)).
3. Barać, Z., Bedrica, L., Čačić, M., Dražić, M., Dadić, M., Ernoić, M., Fury, M., Horvath, Š., Ivanković, A., Janječić, Z., Jeremić, J., Kezić, N., Marković, D., Mioč, B., Ozimec, R., Petanjek, D., Poljak, F., Prpić, Z., Sindičić, M. (2011.): Zelena knjiga izvornih pasmina Hrvatske. Ministarstvo zaštite okoliša i prirode / Državni zavod za zaštitu okoliša i prirode / Zavod za zaštitu prirode / Hrvatska poljoprivredna agencija / Nacionalni park Krka. Zagreb.
4. Čačić, M. (2011.): Genetička analiza lipicanaca u Hrvatskoj. Doktorska disertacija, Zagreb.
5. D'Agaro, E. (2016.): New Advances in NGS Technologies, Trends and Advances in Veterinary Genetics, Muhammad Abubakar, IntechOpen, DOI: 10.5772/66924.
6. Djori, J., Tamang, S., Tschewang, T., Djori, T., Djori, T. Y. (2018.): Genetic diversity and population structure of three traditional horse breeds of Bhutan based on 29 DNA microsatellite markers. *PLoS One*, 13 (6): e0199376.
7. Druml, T., Neuditschko, M., Grliz-Seger, G., Horna, M., Ricard, A., Mesaric, M., Cotoman, M., Pausch, H., Brem, G. (2018.): Population Networks Associated with Runs of Homozygosity Reveal New Insights into the Breeding History of the Haflinger Horse. *Journal of Heredity*, 109: 384-392.
8. FAO (2007.) The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome (izvor: <http://www.fao.org/3/a1250e/a1250e00.htm>).
9. FAO (2011.): Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines. Rome, no. 9.
10. Finno, C. J., Bannasch, D. L. (2014.): Applied equine genetics. *Equine Veterinary Journal*., 46 (5): 538-544.
11. Fumagalli, M., Vieira, F. G., Linderoth, T., Nielsen, R. (2014.): ngsTools: methods for population genetics analyses from next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 30(10): 1486-1487.

12. Gregić, M., Dokić, D., Bobić, T., Gantner, V. (2019.): Genomic Selection in Horse Breeding. *Agro-knowledge Journal*, 20: 107-113.
13. Grilz-Seger, G., Druml, T., Neuditschko, M., Dobretsberger, M., Horna, M., Brem, G. (2019.a): High-resolution population structure and runs of homozygosity reveal the genetic architecture of complex traits in the Lipizzan horse. *BMC Genomics*. 20:174.
14. Grilz-Seger, G., Druml, T., Neuditschko, M., Mesarič, M., Cotoman, M., Brem, G. (2019.b): Analysis of ROH patterns in the Noriker horse breed reveals signatures of selection for coat color and body size. *Animal Genetics*, 50(4): 334-346.
15. Ivanković, A. (2005.): Uporaba molekularne genetike u animalnoj proizvodnji. *Stočarstvo*, 59: 121-144.
16. Ivanković, A., Ramljak, J. (2020.): Uzgojni programi i selekcija – izazov suvremenog konjogojstva. 7. savjetovanje uzgajivača konja u Republici Hrvatskoj 6.11.2020. *Osijek. Zbornik predavalja*: 14-18.
17. Jovanovac, S. (2005.): Populacijska genetika domaćih životinja. Skripta. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Osijek.
18. Jovanovac, S. (2012.): Principi uzgoja životinja. Poljoprivredni fakultet, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku. Osijek.
19. Khanshour, A., Conante, E., Juras, R., Cothran, E. G. (2013.): Microsatellite Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of Arabian Horse Populations. *Journal of Heredity*, 104(3): 386-398.
20. Machmoum, M., Boujenane, I., Azelhak, R., Badaoui, B., Petit, D., Piro, M. (2020.): Genetic Diversity and Population Structure of Arabian Horse Populations Using Microsatellite Markers. *Journal of Equine Veterinary Science*, 93: 103200.
21. McCue, M. E., Bannasch, D. L., Petersen, J. L., Gurr, J., Bailey, E., Binns, M. M., Distl, O., Gue´rin, G., Hasegawa, T., Hill, E. W., Leeb, T., Lindgren, G., Penedo, M. C. T., Røed, K. H., Ryder, O. A., Swinburne, J. E., Tozaki, T., Valberg, S. J., Vaudin, M., Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mickelson, J. R. (2012.): A High Density SNP Array for the Domestic Horse and Extant Perissodactyla: Utility for Association Mapping, Genetic Diversity, and Phylogeny Studies. *PLOS Genetics*, 8: e1002451.
22. Metzger, J., Karwath, M., Tonda, R., Beltran, S., Águeda, L., Gut, I. G., Distlo, O. (2015.): Runs of homozygosity reveal signatures of positive selection for reproduction traits in breed and non-breed horses. *BMC Genomics*, 16:764.
23. Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025. (2021.). Republika Hrvatska, Ministarstvo

(izvor:[https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/pristup\\_info/zakoni\\_pr opisi/zakoni\\_poljoprivreda/Nacionalni\\_program\\_izvornih\\_i\\_ugrozenih\\_pasmina\\_2021\\_-2025.pdf](https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/pristup_info/zakoni_pr opisi/zakoni_poljoprivreda/Nacionalni_program_izvornih_i_ugrozenih_pasmina_2021_-2025.pdf))

24. Peripolli, E., Munari, D. P., Silva, M. V, G. B., Lima, A. L. F., Irgang, R., Baldi, F. (2016.): Runs of homozygosity: current knowledge and applications in livestock. *Animal Genetics*, 48(3): 255-271.
25. Petersen, J. L., Mickelson, J. R., Cothran, G., Andersson, L. S., Axelsson, J., Bailey, E., Bannasch, D., Binns, M. M., Borges, A. S., Brama, P., Machado, A. da C., Dist, O., Felicetti, M., Fox-Clipsham, L., Graves, K. T., Gue´rin, G., Haase, B., Hasegawa, T., Hemmann, K., Hill, E. W., Leeb, T., Lindgren, G., Lohi, H., Lopes, M. S., McGivney, B. A., Mikko, S., Orr, N., Penedo, M. C. T., Piercy, R. J., Raekallio, M., Rieder, S., Røed, K. H., Silvestrelli, M., Swinburne, J., Tozaki, T., Vaudin, M., Wade, C. M., McCue, M. E. (2013.): Genetic Diversity in the Modern Horse Illustrated from Genome-Wide SNP Data. *Genetic Diversity of the Horse*, 8: e54997.
26. Polak, G., Gurgul, A., Jasielczuk, I., Szmatoła, T., Krupiński, J., Bugno-Poniewierska, M. (2021.): Suitability of Pedigree Information and Genomic Methods for Analyzing Inbreeding of Polish Cold-Blooded Horses Covered by Conservation Programs. *Genes (Basel)*, 12(3):429.
27. Potočnik, K. (2018.): The use of new technologies in horse selection. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 21, 2018(4): 186–189.
28. Próchniak, T., Kasperek, K., Knaga, S., Rozempolska-Rucińska, I., Batkowska, J., Drabik, K., Zieba, G. (2021.): Pedigree Analysis of Warmblood Horses Participating in Competitions for Young Horses. *Frontiers in Genetics*, 12: 658403.
29. Rothschild, M. F. (2017.): Genomics and genetics: A daily double for the horse industry. *Equine Veterinary Journal*, 49: 260-262.
30. Sadeghi, R., Moradi-Shahrbabak, M., Ashtiani, S. R. M., Schlamp, F., Cosgrove, E. J., Antczak, D. F. (2019.): Genetic Diversity of Persian Arabian Horses and Their Relationship to Other Native Iranian Horse Breeds. *Journal of Heredity*, 110(2): 173-182.
31. Schaefer, R. J., Schaubert, M., Bailey, E., Bannasch, D. L., Barrey, E., Bar-Gal, G. K., Brem, G., Brooks, S. A., Distl, O., Fries, R., Finno, C. J., Gerber, V., Hassel, B., Jagannathan, V., Kalbfleisch, T., Leeb, T., Lindgren, G., Lopes, A. S., Mach, N., Machado, A. da C., MacLeod, J. N., McCoy, A., Metzger, J., Penedo, C., Polani, S.,

- Rieder, S., Tammen, I., Tetens, J., Thaller, G., Verini-Supplizi, A., Wade, C. M., Wallner, B., Orlando, L., Mickelson, J. R., McCue, M. E. (2017.): Developing a 670k genotyping array to tag ~2M SNPs across 24 horse breeds. *BMC Genomics*, 18(1).
32. Schiavo, G., Muñoz, M., Bovo, S., García- Casco, J., Ribani, A., Tinarelli, S., Djurkin-Kušec, I., Radovic, C., Savic, R., Gallo, M., Candek-Potokar, M. (2019.): Runs of homozygosity provide a genome landscape picture of inbreeding and genetic history of European autochthonous and cosmopolitan pig breeds. *Proceedings of the 37th International Conference on Animal Genetics, Lleida, Spain / Pena, Romi. Lleida, Spain*, str. 144-144.
33. Stock, K. F., Jónsson, L., Ricard, A., Mark, T. (2016.): Genomic applications in horse breeding. *Animal Frontiers*, 6 (1): 45-52.
34. Šantek, M. (2016.): Genomska procjena inbridinga na temelju markera spolnih kromosoma. *Diplomski rad, Zagreb*.
35. Zhang, C., Ni, P., Ahmad, H. I., Gemingguli, M., Baizilaitibei, A., D Gulibaheti, D., Fang, Y., Wang, H., Asif1, A. R., Xiao, C., Chen, J., Ma, Y., Liu, X., Du, X., Zhao, S. (2018.): Detecting the Population Structure and Scanning for Signatures of Selection in Horses (*Equus caballus*) From Whole-Genome Sequencing Data. *Evolutionary Bioinformatics*, 14: 1-9.

Internet izvori:

<https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/whole-genome-sequencing.html> (datum pregleda: 23.7.2021.)

## 6. SAŽETAK

Brz napredak molekularne i genetske tehnologije te bioinformatike omogućio je nove alate za bržu i precizniju genomsku procjenu životinja. Genomski markeri korisni su za predviđanje uzgojnih vrijednosti i odabir određenih fenotipskih svojstava te genetsko poboljšanje kojim se utječe na proizvodna svojstva, a donosi ekonomska dobit. Ovo omogućuje brži odabir superiornih jedinki i prije spolne zrelosti. Genomski markeri se ne primjenjuju samo u svrhu unapređenja uzgoja komercijalnih pasmina, već i u svrhu zaštite i očuvanja izvornih pasmina od izumiranja. Stvaranje visokoproizvodnih životinja je utjecalo na smanjenje genetske raznolikosti, povećanje homozigotnosti, pojavu genetskih bolesti te gubitak izvornih pasmina domaćih životinja. Uporabom genomskih markera moguće je lakše i točnije procjeniti strukturu promatrane populacije, bolje upravljati genetskom raznolikošću, kao i križanjem u srodstvu. Prednosti su mnogobrojne: smanjenje generacijskog intervala u programima uzgoja i veći učinak selekcije, izolacija genetskih bolesti, razvoj poželjnih osobina, veća manipulacija u uzgoju pasmina i uzgojnih tipova konja.

Cilj diplomskog rada bio je prikazati načine kojima se opisuje struktura i genetska različitost neke populacije uporabom markera visoke razlučivosti s posebnim osvrtom na njihovu primjenu u konja.

Ključne riječi: populacijska struktura, genetska različitost, genomska procjena, konji



## **7. SUMMARY**

Fast advances in molecular technologies and bioinformatics enabled new tools for faster and more accurate genomic estimation of livestock animals. Genomic markers are useful for the prediction of breeding values and the selection of phenotypical traits of interest. This enables faster selection of superior individuals even before their sexual maturity. Genomic markers are not used solely for the improvement of commercial breeds, but also for the protection and conservation of native breeds. The creation of highly productive animals influenced the reduction of genetic diversity, increase of homozygosity, development of hereditary diseases and loss of autochthonous breeds.

By using the genomic markers it is possible to estimate the structure of the population more easily, but also to manage genetic variability and inbreeding more efficiently. They provide multiple advantages: decrease of generation interval, better selection efficiency, isolation of genetic diseases and better manipulation of breeding types.

The aim of this thesis was to show methods by which a certain population can be described on a genomic level, with special emphasis on the application of novel genomic tools in horse breeding.

Key words: population structure, genetic diversity, genomic estimation, horses

## **8. POPIS TABLICA**

Tablica 1. Definiranje statusa ugroženosti izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj obzirom na efektivnu veličinu populacije ( $N_e$ ) prema Nacionalnom programu izvornih i zaštićenih pasmina domaćih životinja (izvor: Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025.)

Tablica 2. Izračun ROH segmenata i koeficijenta inbridinga FROH kod lipicanske pasmine konja (izvor: Grilz-Seger i sur., 2019.a)

## 9. POPIS SLIKA

Slika 1. Hodogram uporabe panela od 18 mikrosatelita (prema preporuci ISAG-a) za dokazivanje roditeljstva (Izvor: <http://www.xeneticafontao.com/eng/pruebalab.php?id=9>)

Slika 2. Ilustracija izgleda SNP mikročipa tvrtke Illumina i aplikacije DNA na isti (Papst, 2019.)

Slika 3. Primjer populacijske mreže visoke razlučivosti u klaster analizi (izvor: Druml i sur., 2018.)

Slika 4. Prikaz globalne distribucije gena, varijanti SNP-ova i potpisa selekcije i 31 autosom kod Noriker pasmine konja(izvor: Zhang i sur., 2018.)

## **10. POPIS GRAFIKONA**

Grafikon 1. Prikaz opadanja efektivne veličine populacije perzijskih arapskih konja ( izvor: Sadeghi i sur. 2019.)

Grafikon 2. PCA analiza na pasmini lipicanskih konja (izvor: Grilz-Seger i sur., (2019. a)

Grafikon 3. Grafički prikaz klastera pojedinačnih populacija za razine križanja (izvor: Grilz-Seger i sur., 2019. a)

Grafikon 4. Broj ROH segmenata raspoređenim u odabranim pasminama konja prema njihovoj duljini (izvor: Metzger i sur. 2020. )

Grafikon 5. Duljine ROH segmenata za lokuse boje kod Noriker pasmine konja (izvor: Grilz-Seger i sur., 2019. b)

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek  
Sveučilišni diplomski studij Zootehnika, smjer Specijalna zootehnika

Diplomski rad

Genomska procjena populacijske strukture i genetske različitosti u konja  
Kristina Zirn

**Sažetak:** Brz napredak molekularne i genetske tehnologije te bioinformatike omogućio je nove alate za bržu i precizniju genomsku procjenu životinja. Genomski markeri korisni su za predviđanje uzgojnih vrijednosti i odabir određenih fenotipskih svojstava te genetsko poboljšanje kojim se utječe na proizvodna svojstva, a donosi ekonomska dobit. Ovo omogućuje brži odabir superiornih jedinki i prije spolne zrelosti. Genomski markeri se ne primjenjuju samo u svrhu unapređenja uzgoja komercijalnih pasmina, već i u svrhu zaštite i očuvanja izvornih pasmina od izumiranja. Stvaranje visokoproizvodnih životinja je utjecalo na smanjenje genetske raznolikosti, povećanje homozigotnosti, pojavu genetskih bolesti te gubitak izvornih pasmina domaćih životinja. Uporabom genomskih markera moguće je lakše i točnije procijeniti strukturu promatrane populacije, bolje upravljati genetskom raznolikošću, kao i križanjem u srodstvu. Prednosti su mnogobrojne: smanjenje generacijskog intervala u programima uzgoja i veći učinak selekcije, izolacija genetskih bolesti, razvoj poželjnih osobina, veća manipulacija u uzgoju pasmina i uzgojnih tipova konja.

Cilj diplomskog rada bio je prikazati načine kojima se opisuje struktura i genetska različitost neke populacije uporabom markera visoke razlučivosti s posebnim osvrtom na njihovu primjenu u konja.

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Ivona Djurkin Kušec

**Broj stranica:** 35

**Broj grafikona i slika:** 9

**Broj tablica:** 2

**Broj literaturnih navoda:** 36

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** populacijska struktura, genetska različitost, genomska procjena, konji

**Datum obrane:** 29.09.2021.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr. sc. Goran Kušec, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivona Djurkin Kušec, mentor
3. doc. dr. sc. Maja Gregić, član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta u Osijeku, Vladimira Preloga 1

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek**  
**University Graduate Studies Agriculture, Special Zootechnics**

**Graduate thesis**

Genomic estimation of population structure and genetic diversity in horses  
Kristina Zirn

**Abstract:** Fast advances in molecular technologies and bioinformatics enabled new tools for faster and more accurate genomic estimation of livestock animals. Genomic markers are useful for the prediction of breeding values and the selection of phenotypical traits of interest. This enables faster selection of superior individuals even before their sexual maturity. Genomic markers are not used solely for the improvement of commercial breeds, but also for the protection and conservation of native breeds. The creation of highly productive animals influenced the reduction of genetic diversity, increase of homozygosity, development of hereditary diseases and loss of autochthonous breeds. By using the genomic markers it is possible to estimate the structure of the population more easily, but also to manage genetic variability and inbreeding more efficiently. They provide multiple advantages: decrease of generation interval, better selection efficiency, isolation of genetic diseases and better manipulation of breeding types. The aim of this thesis was to show methods by which a certain population can be described on a genomic level, with special emphasis on the application of novel genomic tools in horse breeding,

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek  
**Supervisor:** Ivona Djurkin Kušec, Associate Professor

**Number of pages:** 35

**Number of figures:** 9

**Number of tables:** 2

**Number of references:** 36

**Original in:** Croatian

Key words: population structure, genetic diversity, genomic estimation, horses

Thesis defended on date: 29.09.2021.

Reviewers:

1. Goran Kušec, Professor, president
2. Ivona Djurkin Kušec, Associate Professor, supervisor
3. Maja Gregić, Assistant Professor, member

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1