

Genetska varijabilnost kraškog ovčara, tornjaka, šarplaninca i tibetskog terijera

Janeš, Mateja

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:171948>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Mateja Janeš

**GENETSKA VARIJABILNOST KRAŠKOG
OVČARA, TORNJAKA, ŠARPLANINCA I
TIBETSKOG TERIJERA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Mateja Janeš

**GENETIC VARIABILITY OF THE KARST
SHEPHERD, TORNJAK, SARPLANINAC
AND TIBETAN TERRIER**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2020



Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Mateja Janeš

**GENETSKA VARIJABILNOST KRAŠKOG
OVČARA, TORNJAKA, ŠARPLANINCA I
TIBETSKOG TERIJERA**

DOKTORSKI RAD

Mentori: izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik
prof. dr. sc. Peter Dovč

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Mateja Janeš

**GENETIC VARIABILITY OF THE KARST
SHEPHERD, TORNJAK, SARPLANINAC
AND TIBETAN TERRIER**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors: PhD. Vlatka Čubrić Čurik, Associate professor
PhD. Peter Dovč, Full professor

Zagreb, 2020

Bibliografski podaci:

- Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
- Znanstveno polje: Poljoprivreda (agronomija)
- Znanstvena grana: Genetika i oplemenjivanje bilja, životinja i mikroorganizama
- Institucija: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za opće stočarstvo
- Voditelj doktorskog rada: izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik i prof. dr. sc. Peter Dovč
- Broj stranica: 174
- Broj slika: 63
- Broj tablica: 6
- Broj priloga: 7
- Broj literaturnih referenci: 97

Datum obrane doktorskog rada: 23.7.2020.

Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:

1. Prof. dr. sc. Ino Čurik

redoviti profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. Izv. prof. dr. sc. Gregor Gorjanc

izvanredni profesor Roslin Instituta Sveučilišta u Edinburghu

3. Doc. dr. sc. Boris Lukić

docent Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek Sveučilišta JJ Strossmayer u Osijeku

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p. 550, 10000 Zagreb, Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog Fakulteta, održanoj dana 10.3.2017., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 14.6.2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZJAVA O IZVORNOSTI

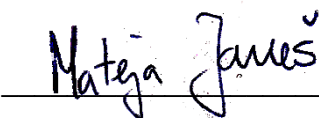
Ja, **Mateja Janeš**, izjavljujem da sam samostalno izradila doktorski rad pod naslovom:

**GENETSKA VARIJABILNOST KRAŠKOG OVČARA, TORNJAKA,
ŠARPLANINCA I TIBETSKOG TERIJERA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovog dokorskog rada;
- da je doktorski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

Zagreb, 22.4.2020.



Potpis doktoranda

Ocjena doktorskog rada

Ovu disertaciju ocijenilo je povjerenstvo u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Ino Čurik (predsjednik)

redoviti profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. Izv. prof. dr. sc. Gregor Gorjanc

izvanredni profesor Roslin Instituta Sveučilišta u Edinburghu

3. Doc. dr. sc. Boris Lukić

docent Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek Sveučilišta JJ Strossmayer u Osijeku

Disertacija je obranjena na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, dana
pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Ino Čurik


_____ *redoviti profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

2. Izv. Prof. dr. sc. Gregor Gorjanc


_____ *izvanredni profesor Roslin Instituta Sveučilišta u Edinburghu*

3. Doc. dr. sc. Boris Lukić


_____ *docent Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek Sveučilišta JJ Strossmayer u Osijeku*

Mentor: **Izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik**

Vlatka Čubrić Čurik rođena je 05. prosinca 1972. godine u Zagrebu. Diplomirala je 1998. godine na smjeru "Stočarstvo" na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija nagrađena je Rektorovom i Dekanovom nagradom. Magistrirala je 2005. godine na Sveučilišta u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Doktorat znanosti stekla je 2009. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Kao mentor uspješno vodi tri doktorata. Od 2016. godine je izvanredni profesor na Agronomskom fakultetu gdje predaje (voditelj) "Animalnu genetiku", "Molekularnu genetiku" , "Strukturu i analizu animalnog genoma i "Varijabilnost Y kromosoma i mtDNA". Autor ili koautor je u više od 50 znanstvenih radova (27 radova indeksirano je u WOS core collection) od kojih su mnogi objavljeni u prestižnim časopisima koji proučavaju nasljeđivanje (PLoS One, Animal Genetics, Genetic Selection Evolution, Frontiers in Genetics, Journal of Animal Breeding and Genetics, Journal of Dairy Research, itd.). Recezent je u mnogim znanstvenim časopisima. Od 2012-2018. predstojnik je Zavoda za opće stočarstvo. Od 2016. do 2019. voditelj je radnog paketa zavodskog projekta "Smart Integration of Genetics with Sciences of the Past in Croatia: Minding and Mending the Gap" ("MendTheGap") koji je u pozivu H2020-TWINN-2015 (Twinning: Spreading excellence and Widening Participation) bio najbolje rangirani projekt od ukupno 546 prihvaćenih projekata. Suradnik je u nekoliko EU projekata. Trenutno operativno vodi izgradnju arheogenetičkog laboratorija Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor: **Prof. dr. sc. Peter Dovč**

Peter Dovč rođen je 15.7.1958. godine u Ljubljani u Sloveniji. Oženjen je Petrom Sölch Dovč i otac je dvaju sinova, Šimuna i Sebastijana. Diplomirao je na Biotehničkom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani 1981. godine i dobio fakultetsku nagradu France Prešern za tezu o povezivanju kromosoma. Na istom fakultetu upisao je magistarski studij Genetika i oplemenjivanje životinja, a 1984. upisao je doktorski studij na Tehničkom Sveučilištu u Münchenu, na kojemu je 1988. godine doktorirao na temi „Prijenos i ekspresija goveđeg pre-alpha s1-casein B gena i hepatitis B površinskog antigena“. Njegov doktorski rad nagrađen je nagradom TUM za doktorande. Nakon postdoktorske pozicije na Sveučilištu Justus Liebig u Giessenu i na Sveučilištu Ludwig Maximilian u Münchenu, pridružio se novoosnovanom Gendiagnosezentrumu u Grubu, München, 1992. godine. U akademskoj godini 1994/95. Bio je gostujući stipendist na Odjelu za animalne znanosti na Sveučilište u Kaliforniji, u Davisu. Od 1995. predaje genetiku, uzgoj životinja, biotehnologiju životinja i molekularnu biologiju na Sveučilištu u Ljubljani. Od 2001. redoviti je profesor genetike i biotehnologije životinja. Na Odjelu za animalne znanosti na Biotehničkom fakultetu vodi istraživački program komparativne genomike i biološke raznolikosti genoma. Njegove su glavne teme istraživanja genomika biologije laktacije, mitohondrijska genetika, alternativno spajanje RNA, identifikacija kandidatnih gena za rast i taloženje masti primjenom komparativnog pristupa, antigena varijacija u ptičjim mikoplazmama, imunološki odgovor i očuvanje genetike. Sa svojom grupom sudjelovao je u četiri projekta EU-a. Objavio je preko 100 znanstvenih članaka u međunarodnim znanstvenim časopisima, šest poglavlja knjiga i više od 80 priloga kongresa. Njegov rad citiran je više od 2100 puta, a njegov h-indeks je 21. Bio je mentor 22 doktoranda. Od 1996. do 2000., od 2008. do 2012. i trenutno je predsjednik Genetskog društva Slovenije, a trenutno je i član Odbora za agribiotehnologiju Europske biotehnoške federacije i član Programskog odbora EU-a 7.thFP. Od 2005. do 2010. godine obnašao je dužnost predsjednika Znanstvenog vijeća Slovenske istraživačke agencije (ARRS). Član je uredništva časopisa Journal of Animal breeding and Genetics, Journal of Biomedicine and Biotechnology, izvanredni urednik u Frontiers in Genetics i glavni urednik Acta agriculturae Slovenica. Recenzent je za nekoliko međunarodnih znanstvenih časopisa i za različite istraživačke agencije. Gostujući je profesor na Sveučilištu u Sarajevu, Sveučilištu u Podgorici i Erasmus / Sokrat profesor na Sveučilištu u Milanu. Dobio je nagradu za mladog profesora sa Sveučilišta u Ljubljani (1997), Međunarodne nagrade za animalnu genetiku (1998), Slovenske nacionalne nagrade za istraživanje Sigismunda Zoisa (2007), Nagrade Sveučilišta u Ljubljani (2018) i Nagrade Fran Jesenko za životno djelo (2019). Od 2008. godine djeluje kao aktivni voditelj pasa za traganje i spašavanje u okviru Jedinice civilne zaštite Slovenije.

Zahvala

Rekli su mi da za odabir teme doktorske disertacije „ljubav prema psima“ nije dovoljan razlog pa sam zagrebla malo dublje, čitala puno više, upoznala razne pse i otkrila nove stvari o tim divnim bićima bez kojih, po mom mišljenju, danas ne bi bilo ni stočarstva. Tog mog puta, a ni ove disertacije ne bi bilo bez nekih ključnih osoba, kojima se ovim putem želim zahvaliti.

Najviše hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Vlatki Čubrić Čurik, koja mi je dopustila da svoju ljubav sprovedem u doktorsko djelo. Hvala joj na strpljenju, svim savjetima i svim usavršavanjima koja mi je omogućila.

Također, mom mentoru prof. dr. sc. Peteru Dovču koji me je nesebično primio među svoje i dao korisne laboratorijske, molekularne, genetičke i kinološke savjete.

Veliko hvala prof. dr. sc. Ini Čuriku na vođenju populacijsko statističkog plana moje disertacije i tehničkom vodstvu.

Doc. dr. sc. Minji Zorc zahvaljujem na usmjeravanju tokom pisanja radova i velikoj pomoći pri bioinformatičkom dijelu manipuliranja podacima kao i strpljivosti i prijateljstvu.

Doc. dr. sc. Maji Ferenčaković se zahvaljujem na snažnoj motivaciji, svim savjetima i svojoj pomoći.

Zahvaljujem kolegama, a prije svega prijateljima Jeleni Lujić, Zoranu Marinoviću, Saši Mariću, Anji Perčić, Samantha Gorjanc, Jeleni Zorc, Juliji Benko, Tanji Tesovnik, Katji Skulj, Jerneju Tomincu, Idi Đurđević, Jerneju Bravničaru, Tinetu Pokornu, Vladimiru Brajkoviću i Ivani Držaić na nesebičnim sugestijama i uvijek dobronamjernom društvu.

Hvala mojim kolegama i prijateljima kinolozima Ljiljani Vlašić, Ljiljani Nakić-Petrini i Primožu Peru na pomoći pri skupljanju uzoraka, kao i Hrvatskom Kinološkom Savezu i Kinološkoj Zvezi Slovenije i svim njihovim kolegama vlasnicima i uzgajivačima koji su bili dio ove priče.

Veliku zahvalnost dugujem i mojoj majci i dečku Tomislavu te njegovoj obitelji na svoj podršci, svom razumijevanju i strpljivosti oko savladavanja svih prepreka koje jedna doktorska disertacija nosi.

Posebno hvala ide psima, bićima bez kojih moj cijeli život jednostavno ne bi imao smisla; Chinkyju i Wendy.

Sažetak

Psi kao atraktivni genetski model pokazuju impresivne međupasminske varijacije i visok stupanj pasminske homogenosti, a karakterizira ih značajan stupanj inbridinga i fiksiranja fenotipskih osobina. Određene pasmine uzgojene su na istom lokalitetu sa sličnim ciljevima te dijele zajedničku genetsku pozadinu. U ovom doktorskom radu analizirana je genetska struktura pastirskih pasmina pasa (LGD) s fokusom na tornjaka, šarplaninca i kraškog ovčara. Kao primjer pasmine s ekstremno „uskim grlom“ proučavane su linije tibetskog terijera osnovane u zapadnom svijetu i uzorci populacije izvornih tibetskih terijera. Za potrebe ove doktorske disertacije uzorkovano je 50 tornjaka, 50 šarplaninaca, 200 kraških ovčara i 64 tibetska terijera. Genealoške informacije o tornjaku i kraškom ovčaru izračunate su pomoću programa MaGelAn 1.0. Ispitano je 18 mikrosatelitnih lokusa koje je predložilo Međunarodno društvo za genetiku životinja (ISAG) na ukupno 101 uzorku. Za određivanje genetske varijabilnosti kontrolne regije mitohondrijske DNA (CR mtDNA) analizirali smo ukupno 400 CR-a mtDNA. Uzorci 12 kraških ovčara, 12 šarplaninaca, 24 tornjaka i 24 tibetska terijera genotipizirani su nizom Illumina CanineHD BeadChip. Za daljnju analizu ukupno smo dodali 577 uzoraka od 46 pasmina i 10 uzoraka sivog vuka iz javno dostupnih baza podataka. Filogenetski odnosi analizirani su korištenjem mreže NeighborNet temeljene na Nei udaljenosti pomoću softvera SplitsTree4. Uzorci rascjepa i mješavina otkriveni su korištenjem softvera Treemix. Za ispitivanje strukture populacije iz podataka SNP čipa i mikrosatelita korištena je metoda grupiranja utemeljena modelom STRUCTURE. Nizovi homozigotnosti (ROH) identificirani su koristeći SNP & Variation Suite v8.8.3. Rezultati genetske varijabilnosti kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka pokazuju da su to tri jasno odijeljene pasmine koje pripadaju u grupu pastirskih pasa. Tornjaci su bliže srodni šarplanincima, dok su kraški ovčari nešto bliži njemačkom ovčaru. Tornjaka i šarplaninca karakterizira nizak stupanj i dugih i kratkih ROH-ova, dok kraški ovčar ima nešto viši stupanj. Rezultati tibetskih terijera otkrivaju značajnu razliku u genetskoj varijabilnosti između izvorne populacije tibetskog terijera i njegove zapadne populacije te su tibetski terijeri bliže srodni malim tibetskim pasminama pasa nego drugim terijerima. Izvornu populaciju tibetskog terijera karakterizira nizak stupanj, dok zapadna populacija ima znatno viši stupanj dugog ROH-a, a niska razina inbridinga izvornih tibetskih terijera rezultat je veće efektivne veličine populacije u usporedbi s njihovom zapadnom populacijom. Znanstveni doprinos je bolje razumijevanje genetskih struktura pasmina pasa malih efektivnih veličina, u svrhu poboljšanja uzgojno-seleksijskog rada kinoloških organizacija.

Ključne riječi: molekularni biljezi, genetska varijabilnost, filogenetika, struktura populacije, niz homozigotnosti, pas, kraški ovčar, šarplaninac, tornjak, tibetski terijer

Abstract

Dogs as an attractive genetic model exhibit impressive inter breed variation and high degree of breed homogeneity, characterized by considerable degree of inbreeding and fixation of phenotypic traits. Certain breeds were bred locally with similar goals sharing common genetic background. In this thesis genetic structure of livestock guarding dogs (LGD) was analysed with a focus on Tornjak, Sharplanina Dog and Karst Shepherd. As an example of a breed with extreme bottleneck, western lineages of Tibetan Terrier and native Tibetan Terriers were analysed. 50 Tornjaks, 50 Sharplanina Dogs, 200 Karst Shepherds and 64 Tibetan Terriers were sampled. Genealogical information of Tornjaks and Karst Shepherds were calculated using the MaGeILAn 1.0 software. 18 microsatellite loci proposed by the International Society of Animal Genetics (ISAG) were examined on 101 samples. To determine the genetic variability of the mitochondrial DNA control region (CR mtDNA), 400 CRs mtDNA were analysed. 12 Karst Shepherds, 12 Sharplanina Dogs, 24 Tornjaks and 24 Tibetan Terriers were genotyped with the Illumina CanineHD BeadChip. We added a total of 577 samples from 46 breeds and 10 gray wolfs from publicly available databases. Phylogenetic relationships were analyzed using a NeighborNet network based on Nei distance using SplitsTree4 software. Patterns of population splits and mixtures were detected using Treemix. STRUCTURE was used to examine the population structure from SNP chips and microsatellites. Runs of homozygosity (ROHs) were identified using SNP & Variation Suite. Genetic variability of Karst Shepherd, Sharplanina Dog and Tornjak shows that these are three clearly separated breeds from shepherd group. Tornjaks are closely related to Sharplanina Dog, while Karst Shepherds are closer to German Shepherds. Tornjak and Sharplanina Dog are characterized by a low degree of ROHs, while the Karst Shepherd has a slightly higher degree. They all have lower inbreeding and higher effective population sizes than some modern dog breeds. Results of Tibetan Terriers reveal a significant difference in genetic variability between the native population of the Tibetan Terrier and its western population, and Tibetan Terriers are closely related to small Tibetan dog breeds than other terriers. Native Tibetan Terriers are characterized by a low degree of long ROH, while the western population has a significantly higher degree of long ROH, and the low level of inbreeding of native Tibetan Terriers is the result of a larger effective population size compared to the western Tibetan Terrier population. Scientific contribution is in a better understanding of the genetic structures of dog breeds with small effective sizes, which can give better recommendations for breeding and selection.

Keywords: molecular markers, genetic variability, phylogenetics, structure, runs of homozygosity, dog, Karst Shepherd, Sharplanina Dog, Tornjak, Tibetan Terrier

Popis kratica

Kratica	Značenje
AKC	engl. American Kennel Club – Američki kinološki klub
ATP	adenozin trifosfat
BIS	engl. best in show – najbolji pas izložbe
bp	bazni par
CNV	engl. copy-number variation – varijacija broja kopija gena
CR (D-loop)	engl. control region – kontrolna regija mtDNA
DLVKOS	Društvo ljubiteljev in vzrediteljev kraških ovčarjev Slovenije - Slovensko društvo ljubitelja i uzgajivača kraških ovčara
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
F	koeficijent inbridinga
f	engl. kinship - srodnički odnos
FCI	fra. Federation Cynologique International – Međunarodna kinološka federacija
GenBank	baza javno dostupnih nukleotidnih slijedova
HKS	Hrvatski kinološki savez
HVI i HVII	hipervarijabilne regije D petlje mitogenoma
IBD	engl. identical by descent - identičan po podrijetlu
IBS	engl. identical by state - identičan po stanju
ISAG	engl. International Society for Animal Genetics
kb	kilo-bazni par
KZS	slo. Kinološka zveza Slovenije - Slovenski kinološki savez
LD	engl. linkage disequilibrium – neravnoteža vezanosti
LGD	engl. livestock guardian dog - pastirski pas
mitogenom	mitohondrijski genom
mtDNA	mitohondrijska DNA
Ne	efektivna veličina populacije
NGS	engl. next generation sequencing - određivanje nukleotidnih slijedova druge generacije
PCA	engl. principal component analysis - analiza glavnih komponenti
ROH	engl. runs of homozygosity - nizovi homozigotnosti
SNP	Single Nucleotid Polymorphism – polimorfizam jednog nukleotida
STR	engl. short tandem repeat - tandemska ponavljanje kratkih nukleotidnih sekvenci
VNTR	engl. variable number tandem repeat – tandemska ponavljanje varijabilnog broja nukleotidne sekvence

Popis tablica

Tablica 1. Korišteni reagensi i dijelovi PCR reakcije za umnožavanje kontrolne regije mtDNA.....	77
Tablica 2. Korišteni reagensi i dijelovi PCR reakcije za umnožavanje ISAG seta mikrosatelita.....	78
Tablica 3. Statistika koncentracije i čistoće DNA pasa i vuka	85
Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA ...	148
Tablica 5. Konstruirani haplotipovi CR-a mtDNA pasa prikazani MJ mrežom za set s kraškim ovčarem, šarplanincem i tornjakom.....	171
Tablica 6. Konstruirani haplotipovi CR-a mtDNA pasa prikazani MJ mrežom za set s tibetskim terijerom.....	174

Popis slika

Slika 1. Logo Međunarodnog kinološkog saveza (FCI, 2019).....	26
Slika 2. Logo Hrvatskog kinološkog saveza (HKS, 2019).	28
Slika 3. Najljepši pas izložbe Euro Dog Show 2007 - Sun Della Baia Azzurra (HKS, 2019).	28
Slika 4. Štenci tornjaka na straži (arhiva fotografija Lorene Kovačićek).	29
Slika 5. Graničarski koli u ovčarenju (arhiva fotografija Alena Marekovića).	31
Slika 6. Hrvatski ovčar (arhiva fotografija Alena Marekovića).	32
Slika 7. FCI Grupa 1: Ovčarski i stočarski psi. Slijeva nadesno to su: 1) kelpie, 2) belgijski ovčar, 3) šiperki, 4) hrvatski ovčar, 5) boseron, 6) briard, 7) pirinejski ovčar duge dlake, 8) pikardijski ovčar, 9) pirinejski ovčar kratke dlake, 10) njemački ovčar, 11) bradati ovčar, 12) graničarski koli, 13) dugodlaki škotski ovčar, 14) kratkodlaki škotski ovčar, 15) staro engleski ovčar bobtail, 16) šetlenski ovčar, 17) velški korgi kardigan, 18) velški korgi pembrok, 19) komondor, 20) kuvas, 21) mudi, 22) puli, 23) pumi, 24) bergamski pastirski pas, 25) maremano abruceški pastirski pas, 26) poljski nizijski ovčar, 27) podhalanski ovčar, 28) aireški ovčar, 29) rumunjski karpatski ovčarski pas, 30) rumunjski ovčarski pas mioritik, 31) južnoruski ovčar, 32) čehoslovački vučji pas, 33) slovački ovčarski pas, 34) katalonski ovčar, 35) majorški ovčar duge i kratke dlake, 36) bijeli švicarski ovčar, 37) nizozemski kovrčavi ovčar, 38) nizozemski ovčar, 39) sarlosov vučji pas, 40) australijski ovčar, 41) australijski govedar, 42) ardenski govedar, 43) flandrijski govedar (Google slike, 2019).	33
Slika 8. FCI grupa 2: Pinčeri i šnaučeri – molosi i švicarski pastirski psi. Slijeva nadesno to su: 1) austrijski pinč, 2) dansko švedski stočarski pas, 3) majmunski pinč, 4) doberman, 5) pinč, 6) patuljasti pinč, 7) veliki šnaučer, 8) patuljasti šnaučer, 9) šnaučer, 10) nizozemski pinč, 11) ruski crni terijer, 12) argentinski pas, 13) brazilski pas, 14) šar pei, 15) danski pas, 16) bordoška doga, 17) bokser, 18) njemačka doga, 19) rotvajler, 20) buldog, 21) bulmastif, 22) mastif, 23) cane corso, 24) napuljski mastif, 25) japanski mastif, 26) pas svetog Miguela, 27) majorški mastif, 28) kanaarski pas, 29) urugvajski kimaron, 30) tornjak, 31) newfoundlander, 32) pirinejski planinski pas, 33) hovavart, 34) leonberger, 35) landsir, 36) atlaski pastirski pas, 37) šarplaninac, 38) pastirski pas iz laboreira, 39) estrelski planinski pas, 40) alentejski mastif, 41) južnoistočno europski pastirski pas bucovina, 42) kavkaski ovčar, 43) srednje azijski ovčar, 44) kraški ovčar, 45) pirinejski mastif, 46) španjolski mastif, 47) bernardinac, 48) tibetski mastif, 49) kangal, 50) apencelski pastirski pas, 51) bernski planinski pas, 52) entleburški planinski pas, 53) veliki švicarski planinski pas (Google slike, 2019).	34
Slika 9. Kraški ovčar s lipicancima (KZS, 2019).	35
Slika 10. Tornjak i šarplaninci (arhiva fotografija Lorene Kovačićek).	35
Slika 11. Kraški ovčar (KZS, 2019).	37
Slika 12. Sentinel the Croat (Wikidata, 2019).	40
Slika 13. Tornjak Zogar All-Petrina's "Zogy" (arhiva fotografija Ljiljane Nakić-Petrine).	41
Slika 14. Štenci tornjaka (arhiva fotografija Lorene Kovačićek).	42
Slika 15. Šarplaninci (arhiva fotografija Nikoline Kovačević Ganić).	43
Slika 16. Nero od Grobnika, mužjak pasmine šarplaninac (3 god.) (arhiva fotografija Nikoline Kovačević Ganić).	44
Slika 17. FCI grupa 3: Terijeri. Slijeva nadesno to su: 1) brazilski terijer, 2) njemački lovni terijer, 3) erdelski terijer, 4) bedlington terijer, 5) graničarski terijer, 6) foks terijer kratkodlaki, 7) foks terijer oštrodlaki, 8) lakeland terijer, 9) mančesterski terijer, 10) Parson Russel terijer, 11) velški terijer, 12) irski glen imalski terijer, 13) irski mekodlaki pšenični terijer, 14) irski terijer, 15) irski plavi terijer, 16) australijski terijer, 17) češki terijer, 18) kernski terijer, 19) dandie dinmont terijer, 20) Jack Russel terijer, 21) norfolški terijer, 22)	

norvički terijer, 23) škotski terijer, 24) silihamski terijer, 25) skajeski terijer, 26) zapadnoškotski bijeli terijer, 27) japanski terijer, 28) bul terijer, 29) mini bul terijer, 30) stafordski bul terijer, 31) američki stafordski terijer, 32) australijski svileni terijer, 33) engleski patuljasti terijer i 34) jorkširski terijer (Google slike, 2019).	47
Slika 18. FCI grupa 9: Minijaturni psi i psi pratitelji. Slijeva nadesno to su: 1) kovrčavi bišon, 2) maltezer, 3) bišon havanezer, 4) bolonjezer, 5) mali lavlji pas, 6) pudla, 7) belgijski grifon, 8) briselski grifon, 9) belgijski grifon kratkodlaki, 10) kineski kukmasti pas, 11) lhasa apso, 12) shih tzu, 13) tibetski španijel, 14) tibetski terijer, 15) čivava, 16) kavalir španijel kralja Charlesa, 17) španijel kralja Charlesa, 18) pekinezer, 19) japanski španijel, 20) kontinentalni patuljasti španijel, 21) ruski patuljasti pas, 22) kromfohrlander, 23) mops, 24) francuski buldog, 25) bostonski terijer (Google slike, 2019).	49
Slika 19. Lena, ženka Lamleh linije pasmine tibetski terijer (2,5 god.).	51
Slika 20. Rosie, štene tibetskog terijera.	52
Slika 21. Tibetske pasmine u Tibetu (arhiva fotografija Ljiljane Vlašić).	53
Slika 22. Izvorna populacija Tibetskog terijera u Tibetu (arhiva fotografija Ljiljane Vlašić).	54
Slika 23. Doktorica Agnes Grieg (Google slike, 2019).	55
Slika 24. Bunti (Google slike, 2019).	55
Slika 25. Trojan Kynos (Google slike, 2019).	56
Slika 26. Zapadne linije tibetskog terijera na izložbi pasa (arhiva fotografija Ljiljane Vlašić).	57
Slika 27. Pseći panel za genotipizaciju upotrebom mikrosatelita 1.1 (Tom i sur., 2010).	59
Slika 28. Skica dokazivanja očinstva na psećem mikrosatelitnom lokusu FH2054. Prikazani su ženka, štene i mužjak. Pri analizi samo ovog lokusa u ovom slučaju to su potvrđeni majka i otac ovog šteneta budući da štene na lokusu FH2054 ima alel 168 naslijeđen od majke i alel 170 naslijeđen od oca. Da bismo stvarno potvrdili očinstvo, potrebno je analizirati 22 lokusa predložena od strane ISAG-a.	61
Slika 29. Prikaz eukariotske stanice i njenih glavnih staničnih organela i struktura – prilagođena slika (Google slike, 2019).	62
Slika 30. Pozicija nekodirane regije (CR) i njenih subregija u psećem mitogenomu (Kim i sur., 1998).	63
Slika 31. Prikaz haplogrupe pseće mtDNA. Prikazano je šest grana psećih haplotipova (od A do F) i jedan haplotip kojota. Duljine grana u skladu su s navedenim razmjerima, dok je grana do kojota smanjena za 50 % (Savolainen i sur., 2002).	65
Slika 32. Neighbor-joining stablo konstruirano iz sirovih podataka genetskih distanci koje predstavlja odnose između uzoraka (Vaysse i sur., 2011).	67
Slika 33. Kladogram 161 pasmine pasa (Parker i sur., 2017).	68
Slika 34. Uzorkovanje tornjaka.	73
Slika 35. a) Lokacije podrijetla LGD-ova. LGD-ovi su: ANAT – kangal, KRA – kraški ovčar, GPYR – pirinejski planinski pas, FONN – Fonnijev pas, MARM – maremansko abružanski pastirski pas, SILA – silski pastirski pas, TOR - tornjak, KUVZ - kuvas, SAR – šarplaninac, CAUC – kavkaski ovčar, TIBM – tibetski mastif. b) Naši uzorci balkanskih pastirskih pasa.	74
Slika 36. Uređaj NanoPhotometer P330 Spetrofotometer (IMPLEN, Njemačka) za mjerenje koncentracije DNA (Brajkovic et al. 2018).	75
Slika 37. Uređaj za vodoravnu elektroforezu.	76
Slika 38. Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD).	77
Slika 39. Slika PCR reakcije D-loop mtDNA na agaroznom gelu.	78
Slika 40. <i>Median-joining</i> mreža filogenetskog odnosa haplotipova pronađenih u tornjaka i šarplaninca u odnosu na haplotipove pronađene u drugim pasminama pasa i četiri uzorka vuka. <i>Median-joining</i> mreža konstruirana je na temelju 52 haplotipa koji su dobiveni	

usporedbom 224 uzorka CR-a mtDNA duljine 520 bp. Krugovi su proporcionalni frekvenciji haplotipova. Ljubičasta boja označava referentni haplotip za vrstu <i>Canis familiaris</i> (Kim i sur., 1998), narančasta označava tornjake, tamnocrvena ostale pasmine pasa iz FCI grupe Pinčevi i šnaučeri te molosi i švicarski pastirski psi, svijetloplava pasmine pasa iz FCI grupe Pastirski psi i psi tjerači goveda, tamnoplava pasmine pasa iz FCI grupe Špicevi i primitivni tip pasa, svijetlozelena pasmine pasa iz FCI grupe Goniči, tragači po krvi i srodne pasmine, tamnozeleno pasmine pasa iz FCI grupe Retriveri, španijeli i psi za vodu, žuta pasmine pasa iz FCI grupe Psi za pratnju i rasonodu, bijela pse pasmine međimurski mali pas i siva vukove. Okomite crte označavaju broj mutacija između haplotipova. Detaljnije informacije o pripadnosti pojedine jedinice određenom haplotipu mogu se pronaći u prilogu.	89
Slika 41. <i>Median-joining</i> mreža filogenetskog odnosa haplotipova pronađenih u tibetskih terijera u odnosu na haplotipove pronađene u drugih pasmina pasa iz grupe terijera i patuljastih pasmina pasa i pasa pratitelja te četiri uzorka vuka. <i>Median-joining</i> mreža konstruirana je na temelju 28 haplotipova koji su dobiveni usporedbom 176 uzoraka CR-a mtDNA duljine 567 bp. Krugovi su proporcionalni frekvenciji haplotipova. Ljubičasta boja označava referentni haplotip za vrstu <i>Canis familiaris</i> (Kim i sur., 1998), tamnocrvena boja označava tibetske terijere, narančasta označava pasmine pasa iz FCI grupe Patuljasti psi i psi pratitelji, žuta pasmine pasa iz FCI grupe Terijeri i sive vukove. Okomite crte označavaju broj mutacija između haplotipova. Detaljnije informacije o pripadnosti pojedine jedinice određenom haplotipu mogu se pronaći u prilogu.....	91
Slika 42. Neighbor-joining stablo na osnovi SNP čipa od 161 pasmine pasa otkriva pozicioniranje izvornog tibetskog terijera u klasteru drevnih pasmina iz sirovih genetskih udaljenosti.	92
Slika 43. NeighborNet mreža bazirana na Nei-evim udaljenostima pokazuje odnose 18 pasmina pasa i sivog vuka. Retikulacije na grafu pokazuju prošle hibridizacijske događaje među pasminama. (LGD-ovi: kangal (ANAT), kraški ovčar (KRA), pirinejski planinski pas (GPYR), Fonnijev pas (FONN), maremano abruceški pastirski pas (MARM), silski pastir (SILA), tornjak (TOR), kuvas (KUVZ), šarplaninac (SAR), kavkaski ovčar (CAUC), tibetski mastif (TIBM), popularne pasmine: škotski ovčar (COLL), labrador retriever (LAB), kavalir španijel kralja Charlesa (CKCS), doberman (DOPB), pekinezer (PEKE), njemački ovčar (GSD), haski (HUSK), sivi vuk (WOLF)).....	94
Slika 44. NeighborNet mreža bazirana na Nei-evim udaljenostima pokazuje odnose 27 pasmina pasa i sivog vuka. Retikulacije na grafu pokazuju prošle hibridizacijske događaje među pasminama. Kratice pasmina su: erdeljski terijer (AIR), američki pit bul terijer (APB), američki stafordski terijer (AST), bedlington terijer (BET), graničarski terijer (BORT), bostonski terijer (BOST), bul terijer (BullT), kernski terijer (CT), foks terijer oštrolaki (FTD), Jack Russell terijer (JRT), japanski španijel (Chin), irski plavi terijer (KBT), Lhasa Apso (LHAP), Norfolk terijer (NFT), Norwich terijer (NWT), pekinezer (PEKE), štakorski terijer (RATT), škotski terijer (SCT), Shih Tzu (SHI), svileni terijer (SILT), irski mekodlaki pšenični terijer (SCWT), stafordski bul terijer (SBT), tibetski španijel (TIBS), izvorni tibetski terijer (TTNA), zapadna populacija tibetskog terijera (TTEU), patuljasti foks terijer (TFT), zapadnoškotski bijeli terijer (WHWT), jorkširski terijer (YOR).	96
Slika 45. Stablo najveće vjerodostojnosti prikazuje migracije između pastirskih pasmina pasa i popularnih pasmina pasa.....	97
Slika 46. Stablo najveće vjerodostojnosti prikazuje migracije između azijskih patuljastih pasmina pasa (tibetskog terijera, japanskog španijela, shih tzu, lhasa apso, pekinezera i tibetskog španijela) i terijera.....	99
Slika 47. STRUCTURE analiza mikrosatelita tornjaka podijeljenih u bosanskohercegovačku i hrvatsku populaciju.	100

Slika 48. STRUCTURE analiza mikrosatelita. Jedinke su dodijeljene različitim klasterima pri različitim K vrijednostima. Kratice su TTLA – Lamleh linija tibetskog terijera, TTLU – Luneville linija tibetskog terijera, TTNA – izvorna populacija tibetskog terijera, TT-F1 – F1 generacija križanaca izvornih tibetskih terijera s Lamleh linijom, TT-BC2 – povratno križanje F1 generacije s Lamleh linijom, TT-BC3 – povratno križanje TT-BC2 generacije s Lamleh linijom.....	101
Slika 49. Bayesovo grupiranje izvedeno softverom CLUMPAK na CanineHD BeadChip podacima između LGD-ova vuka i nekih popularnih pasmina pasa. . (LGD-ovi: kangal (ANAT), kraški ovčar (KRA), pirinejski planinski pas (GPYR), Fonnijev pas (FONN), maremano abruceški pastirski pas (MARM), silski pastir (SILA), tornjak (TOR), kuvas (KUVZ), šarplaninac (SAR), kavkaski ovčar (CAUC), tibetski mastif (TIBM), popularne pasmine: škotski ovčar (COLL), labrador retriever (LAB), kavalir španijel kralja Charlesa (CKCS), doberman (DOPB), pekinezer (PEKE), njemački ovčar (GSD), haski (HUSK), sivi vuk (WOLF)).	102
Slika 50. Najinformativnije K vrijednosti procijenjene Evanno delta K postupkom za STRUCTURE analizu SNP čip podataka za skup s kraškim ovčarem, šarplanincem i tornjakom.....	103
Slika 51. STRUCTURE analiza SNP čip podataka tornjaka	104
Slika 52. Genetska struktura terijera i patuljastih i pasa za pratnju. Bayesovo grupiranje izvedeno je softverom CLUMPAK na CanineHD BeadChip podacima od 29 populacija pasmina pasa i sivog vuka (N = 366).	106
Slika 53. Najinformativnije K vrijednosti procijenjene Evanno delta K postupkom za STRUCTURE analizu SNP čip podataka s tibetskim terijerom.	107
Slika 54. STRUCTURE analiza SNP čip podataka tibetskog terijera.	107
Slika 55. PCA analiza mikrosatelita kraškog ovčara, šarplaninca, tornjaka i sivog vuka.	108
Slika 56. PCA analiza mikrosatelita tibetskog terijera. Jasno pokazuje genetsku razliku zapadne i izvorne populacije tibetskog terijera.	109
Slika 57. DAPC analiza genotipa SNP-a vuka i pasa. Prve dvije komponente pokazale su se kao PCA. Genotipovi pasa i vukova projicirani su na treću, četvrtu i petu funkciju diskriminatorne PC analize (DAPC izračunato u ADEGENET-u). (LGD-ovi: ANAT – kangal, KRA – kraški ovčar, GPYR – pirinejski planinski pas, FONN – Fonnijev pas, MARM – maremano abruceški pastirski pas, SILA – silski pastir, TOR – tornjak, KUVZ - kuvas, SAR – šarplaninac, CAUC – kavkaski ovčar, TIBM – tibetski mastif, popularne pasmine: COLL – škotski ovčar, LAB – labrador retriever, CKCS – kavalir španijel kralja Charlesa, DOBP – doberman, PEKE – pekinezer, GSD – njemački ovčar, HUSK – haski).	111
Slika 58. Proporcija autozigotnosti u ROH-u LGD-ova, drugih popularnih pasmina pasa i vuka. Kratice pasmina su: LGD-ovi: ANAT - kangal, CAUC - kavkaski ovčar, FONN – Fonnijev pas, GPYR - pirinejski planinski pas, KRA - kraški ovčar, KUVZ – kuvasz, MARM - maremano abruceški pastirski pas, SILA – silski pastir, SAR – šarplaninac, TIBM – tibetski mastif, TOR - tornjak, popularne pasmine pasa: CKCS - kavalir španijel kralja Charlesa, COLL – škotski ovčar, DOBP - doberman, GSD – njemački ovčar, HUSK – sibirski haski, LAB – labrador retriever, PEKE – pekinezer i WOLF – sivi vuk.	114
Slika 59. Proporcija autozigotnosti u ROH-u tibetskog terijera i drugih pasmina pasa.	115
Slika 60. Integritet DNA 457 uzoraka kraškog ovčara prikazan na gel elektroforezi.	143
Slika 61. Integritet DNA 81 uzorka šarplaninaca prikazan na gel elektroforezi.	145
Slika 62. Integritet uzorka 100 tornjaka prikazan na gel elektroforezi.	146
Slika 63. Integritet DNA četiri uzorka vuka i 62 uzorka tibetskog terijera. (Uzorci vukova broj 1 do broja 4, ostalo tibetanci.)	147

SADRŽAJ

1	UVOD	22
1.1	Hipoteza i ciljevi istraživanja	25
2	PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	26
2.1	Povijest Međunarodnog kinološkog saveza (Fédération Cynologique Internationale - FCI)	26
2.2	Povijest „Hrvatskog kinološkog saveza“ (HKS-a)	27
2.3	Ovčarski i pastirski psi	29
2.3.1	FCI grupa 1: Ovčarski i pastirski psi.....	33
2.3.2	FCI Grupa 2: Pinčeri i šnaučeri – molosi i švicarski pastirski psi	34
2.4	Povijest pastirskih pasmina pasa u Hrvatskoj, Makedoniji, Srbiji i Sloveniji	35
2.4.1	Opis pasmine kraški ovčar.....	37
2.4.2	Opis pasmine tornjak	40
2.4.3	Opis pasmine šarplaninac.....	43
2.5	Drevne pasmine pasa	46
2.5.1	FCI grupa 3: terijeri	47
2.5.2	FCI grupa 9: patuljasti psi i psi pratitelji.....	49
2.5.3	Opis pasmine tibetski terijer.....	51
2.6	Molekularni biljezi u populacijskoj genetici pasa.....	58
2.6.1	Mikrosateliti.....	58
2.6.2	Mitohondrijska DNA	62
2.6.3	Genotipizacija polimorfizama jednog nukleotida na genomu (SNP)	66
3	MATERIJALI I METODE RADA.....	73
3.1	Strategija uzorkovanja i korišteni podaci	73
3.1.1	Prikupljanje uzoraka dlake	74
3.2	Molekularno-genetičke analize.....	75
3.2.1	Ekstrakcija DNA iz dlake.....	75
3.2.2	Provjera kvantitete i kvalitete ekstrahirane DNA	75
3.2.3	Umnažanje mitohondrijske DNA PCR-om.....	76
3.2.4	Umnažanje mikrosatelita PCR-om	78
3.2.5	Pročišćavanje PCR produkata kontrolne regije mtDNA.....	79
3.2.6	Skvenciranje mtDNA i mikrosatelita	79
3.2.7	Određivanje polimorfizama jednog nukleotida na genomu (SNP čip)	80

3.2.8	Analiza mikrosatelita	80
3.2.9	Analiza nukleotidnih sljedova	80
3.2.10	Analiza varijabilnosti mitohondrijske DNA	81
3.2.11	Konstrukcija i vrste haplotipova / haplogrupa	81
3.2.12	Filogenetska analiza	81
3.2.13	Genotipiziranje pomoću SNP-ova – CanineHD BeadChip	81
4	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	85
4.1	Kvantiteta i čistoća ekstrahirane DNA	85
4.2	Filogenetska stabla i mreže	86
4.2.1	Genetska varijabilnost kontrolne regije mitohondrijske DNA kraškog ovčara, tornjaka i šarplaninca	86
4.2.2	Genetska varijabilnost kontrolne regije mitohondrijske DNA tibetskog terijera 90	
4.2.3	Neighbor-joining stablo na osnovi SNP čipova tibetskog terijera	92
4.2.4	NeighborNet mreža na osnovi SNP čipova	94
4.2.5	Treemix stablo na osnovi SNP čipova	97
4.3	Multivarijatne analize	100
4.3.1	STRUCTURE analiza mikrosatelita	100
4.3.2	STRUCTURE analiza SNP čipova	102
4.3.3	Analiza glavnih komponenti (PCA) na osnovi mikrosatelita	108
4.3.4	DAPC analiza SNP čipova kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka	110
4.4	Genomski koeficijent inbridinga procijenjen na temelju ROH analiza	112
4.4.1	Inbriding kraškog ovčara, tornjaka i šarplaninca	112
4.4.2	Inbriding tibetskog terijera	115
5	RASPRAVA	116
5.1	Genetička varijabilnost kraškog ovčara, tornjaka i šarplaninca	117
5.2	Genetička varijabilnost tibetskog terijera	119
5.3	Snaga mikrosatelita i mitohondrijske DNA u odnosu na SNP čipove	121
5.4	Pretpostavke i ograničenja istraživanja	123
5.4.1	Vjerodostojnost literaturnih navoda	123
5.4.2	Uzorkovanje	123
5.4.3	Homoplazija mikrosatelita	123
5.4.4	Priistranost CanineHD Genotyping BeadChipa	123
5.4.5	Financije	124
5.5	Znanstveni doprinos i daljnji izazov	126

6	ZAKLJUČCI	128
7	POPIS LITERATURE.....	130
8	ŽIVOTOPIS.....	140
9	PRILOZI.....	142

1 UVOD

Genetska struktura neke populacije oblikovana je utjecajem različitih mehanizama, uključujući protok gena, pritisak selekcije, mutacije i genetski drift. Mehanizmi variraju ovisno o vremenu i o utjecajima vanjskih i unutrašnjih faktora. Jedan je od najboljih modela za proučavanje genetske raznolikosti unutar vrste domaći pas (*Canis familiaris*) jer se smatra fenotipski najrazličitijim sisavcem i prvom domesticiranom životinjom. Danas Fédération Cynologique Internationale (FCI) kao jedna od krovnih svjetskih kinoloških organizacija priznaje 349 pasmina pasa, dok se smatra da sveukupno u svijetu postoji preko 1000 pasmina. Osim priznatih pasmina, postoje još i moderni križanci, tzv. dizajnerski psi, ali i pasmine u nastajanju. Mikroevolucija pasa pod ljudskim je utjecajem, a obrazac genetske varijabilnosti pogođen je socijalnim, ekonomskim, političkim i kulturnim čimbenicima kroz dug period i na raznim mjestima. Pas je danas sve više vrijedan model u medicinskoj genetici, kako za razumijevanje genetike pasa, tako i za razumijevanje humane genetike nasljeđivanja bolesti. Populacije pasa s malo osnivača i selektivan uzgoj pasa rezultirali su dugim regijama neravnoteže vezanosti (LD) unutar pasmina (više od 1 Mb) dok je LD među pasminama kraći i sličniji ljudskom (Sutter i Ostrander, 2004; Boyko i sur., 2010).

Do sada je već napravljeno puno važnih zapažanja u vezi genetske strukture pseće populacije. Kao prvo, većina čistokrvnih pasa se genetskim biljezima grupira u svoju pasminu (Parker i sur., 2004; Leroy i sur., 2009; Pires i sur., 2009). Ta je činjenica odraz nedavnog porijekla prisutnih pasmina koje su nastale iz ograničenog broja osnivača i formiranju zatvorenih genskih bazena malih efektivnih veličina. Suženje varijabilnosti u populaciji povećava razlike među samim populacijama i tako povećava robustnost „breed assignment“ analize. Na temelju mikrosatelitnih (Parker i sur., 2004; Leroy i sur., 2009); SNP (Vonholdt i sur., 2010) i CNV (Berglund i sur., 2012) podataka, različite pasmine pasa uspješno su grupirane po fenotipskom odnosno funkcionalnom tipu pasmine. Razlikovanje modernih pasmina pasa pod utjecajem je ne samo svoje povijesne povezanosti, već i složenosti uzgoja. Na primjer, radni psi grupiraju se bliže feralnim psima nego pasminama koje se selekcioniraju za izložbe prema svom vanjskom izgledu (Pedersen i sur., 2013). Nadalje, parenje u bliskom srodstvu stvara podskupine unutar pasmine koje se ne podudaraju s tradicionalnim podtipovima priznatim od kinoloških klubova, a u nekim slučajevima genetski se ne mogu razlikovati. Štoviše, algoritmi za genetsko grupiranje ne mogu uvijek razlikovati srodne pasmine koje su se tek nedavno odvojile kao zasebne [na primjer mali i veliki vendeski baset grifon (Parker i sur., 2007)] ili se još uvijek križaju [bul terijer i minijturni bul terijer (Vonholdt i sur., 2010)]. Također, genetski sastav nekoliko pasmina pod snažnim je utjecajem demografskih promjena i križanja različitih pasmina,

uzrokujući kratke internodije na filogenetskim stablima i nizak *bootstrap* koji je u skladu s njihovom mrežastom evolucijom (Vonholdt i sur., 2010).

Nadalje, preciznije razumijevanje faktora koji utječu na odnose između blisko srodnih pasmina u kontekstu promjena režima uzgoja još je uvijek nedovoljno. Kako bismo otkrili zašto naš uvid u povijesne odnose među pasminama ometa koncept same pasmine, trebamo usporediti pasmine zatvorenog registra, pasmine koje su u procesu formalnog priznavanja te feralne pasmine, koje još uvijek imaju zalihu pasa iz autohtone populacije koji se mogu redovito upisivati u pasminske knjige.

Psi koji pripadaju grupi balkanskih pastirskih pasa kao i tibetski terijeri odličan su primjer pasmina pasa koje imaju veći inbriding i manju efektivnu veličinu populacije u odnosu na pse drugih pasmina iz njihovih grupa. Fenotipski su psi svih pasmina balkanskih pastirskih pasa slične veličine i slične obojenosti kao i njihov zajednički predak pastirskog tipa koji je povijesno dugo prisutan na tom dijelu svijeta. Polunomadski način života sa sezonskim migracijama ljudi sa stokom i psima (transhumanca) preferiraju dinamičan tok gena, što je djelomično ograničeno krajobraznim preprekama koje su pridonijele oblikovanju lokalnih ekotipova za suptilno diferenciranje populacija domaćih životinja uključujući i pse (Ceh i Dovc, 2014). Tek je 2007. godine bosanskohercegovačko - hrvatski pastirski pas tornjak priznat od FCI-ja. U postupku priznavanja pasmina je dobila dva podtipa (bosanskohercegovački i hrvatski podtip), ali ta je praksa kasnije ukinuta. Kraški ovčar i šarplaninac su još 1939. od strane FCI-ja svrstane kao dva podtipa iste pasmine, a kao dvije zasebne pasmine priznate su tek 1968. Međutim, od tada je mali broj jedinki kraškog ovčara doveo pasminu do kritične točke, nakon čega su dva mužjaka newfoundland pasmine uključena u uzgoj kraškog ovčara kao jedini izuzetak inače zatvorenih uzgojnih knjiga. Iako je šarplaninac postao rijetka pasmina nakon oba svjetska rata i vjerojatno je sporadično križan s kavkaskim ovčarom, a moguće i nekim drugim pasminama, također je uspio zadržati svoju izvornu populaciju pastirskih pasa sve do danas.

Tibetski terijeri stvoreni su na Tibetu, a radi se o jednoj od najstarijih pasmina na svijetu. Kao i neke druge tibetske pasmine (kao npr. tibetski španijel, tibetski mastif, lhasa apso i slično), uzgajili su ih lame. Specifičnost tibetskih terijera je u tome da su to bili psi koji su se obično poklanjali u znak zahvalnosti. U zapadnom svijetu danas postoje dvije linije tibetskih terijera. Za liniju Lamleh zaslužna je dr. Agnes R. H. Grieg koja je uzgojila prve tri generacije štenaca koje je 1931. registrirao Engleski kinološki savez. S druge strane, za Luneville liniju, čiji uzgoj kreće 1955., ne zna se sa sigurnošću da li su njeni psi osnivači bili čistokrvni tibetski terijeri ili ne.

Za potrebe ove doktorske disertacije korištenjem molekularnih biljega analizirane su populacijske genetske strukture pasa čuvara stoke s Balkana (kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka) i tibetskog terijera. Proučeni su genetički odnosi tih pasa unutar pasmina kao i odnosi tih pasmina s drugim pasminama pasa.

1.1 Hipoteza i ciljevi istraživanja

Hipoteze su slijedeće:

1. Balkanski pastirski psi pripadaju grupi velikih pastirskih pasa, ali predstavljaju međusobno jasno genetski diferencirane populacije.
2. Balkanski pastirski psi imaju veći inbriding i malu efektivnu veličinu populacije u odnosu na ostale pasmine pasa iz grupe LGD.
3. Zapadne linije tibetskih terijera obuhvaćaju samo manji dio genetskog bazena izvornih azijskih tibetskih terijera.
4. Tibetski terijeri imaju veći inbriding i malu efektivnu veličinu populacije u odnosu na pse ostalih pasmina pasa iz grupe terijera.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Procijeniti genetske strukture populacija balkanskih pastirskih pasa (tornjak, kraški ovčar i šarplaninac) putem različitih molekularnih biljega radi jasne genetske diferencijacije pasmina.
2. Procijeniti inbriding i efektivnu veličinu populacije balkanskih pastirskih pasmina pasa te usporediti s ostalim pasminama pasa iz grupe LGD.
3. Procijeniti genetsku strukturu tibetskih terijera zapadnih linija te autohtone tibetske linije putem različitih molekularnih biljega radi jasne genetske diferencijacije pasmina.
4. Procijeniti inbriding i efektivnu veličinu populacije tibetskih terijera s ostalim pasminama pasa iz grupe terijera.

2 PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1 Povijest Međunarodnog kinološkog saveza (Fédération Cynologique Internationale - FCI)

„Međunarodni kinološki savez“ (FCI) međunarodna je krovna organizacija za registraciju pasmina pasa sa sjedištem u Thuinu u Belgiji (Slika 1). Prvotno su FCI osnovale Njemačka, Belgija, Austrija, Francuska i Nizozemska 22. svibnja 1911. godine u Parizu (FCI, 2019).



Slika 1. Logo Međunarodnog kinološkog saveza (FCI, 2019).

Trenutno je pri FCI-ju registrirano 349 pasmina pasa koje su podijeljene u 10 grupa: 1. grupa FCI (ovčari i tjerači stoke), 2. grupa FCI (pinčeri i šnaučeri - molosoidi, švicarski planinski psi i ovčari), 3. grupa FCI (terijeri), 4. grupa FCI (jazavčari), 5. grupa FCI (špicevi i primitivni psi), 6. grupa FCI (goniči), 7. grupa FCI (poenteri i seteri), 8. grupa FCI (retriveri i vodeni psi), 9. grupa FCI (psi pratioci i minijaturne pasmine) i 10. grupa FCI (hrtovi).

Za svaku pasminu registriranu i priznatu od FCI-ja postoji propisan međunarodni standard. U standardu su navedene sve bitne osobine koje pojedini pas mora imati kako bi se smatrao čistokrvnim pripadnikom pasmine. Zemlja iz koje potječe pasmina domovina je pasmine i ona predlaže standard pasmine Komisiji standarda i Znanstvenom povjerenstvu FCI-ja. Danas FCI broji 98 država članica i ugovornih partnera (jedan član po zemlji), a hrvatska kinološka organizacija, tj. „Hrvatski kinološki savez“, jedna je od njih.

2.2 Povijest „Hrvatskog kinološkog saveza“ (HKS-a)

Na našim prostorima počeci organizirane kinologije datiraju iz vremena dok je Hrvatska još bila dio Austro-Ugarske. U Zagrebu je 1881. osnovano „Opće hrvatsko društvo za obranu lova i ribarstva“, a 1891. to se društvo učlanjuje u austrijsko „Društvo za čistokrvne pse“ u Beču. Lovačko društvo 1897. osniva „Komisiju za rodovnu knjigu“ koja podatke o čistokrvnim psima iz Hrvatske i Slavonije šalje u austrijsku temeljnu knjigu za čistokrvne pse. Prva prava izložba pasa s katalogom i ocjenjivačkom komisijom održana je u Zagrebu 1906. u okviru velike Hrvatsko-slavonske zemaljske gospodarske izložbe na kojoj su bila izložena 103 psa raznih pasmina. Godine 1912. održana je u Osijeku prva utakmica međunarodnog značaja za ispitivanje redarstvenih i ratnih pasa. (HKS, 2019).

Nakon I. svjetskog rata u Kraljevini Srba, Hrvata i Slovenaca kinološka aktivnost najjača je u Sloveniji, pa je 1. listopada 1925. u Ljubljani osnovan „Jugoslavenski kinološki savez“ (JKS). JKS je 25. veljače 1929. primljen kao pridruženi, a 2. travnja 1936. kao federativni član FCI-ja.

Za vrijeme II. svjetskog rata 1941 – 1945. dolazi do stagnacije u kinološkim organizacijama. Slovenija je pripojena Njemačkoj, a kinološke veze i suradnja na prostoru podijeljene države potpuno su prestali. U Hrvatskoj kinološka djelatnost nije potpuno stala, ali arhiva i dokumenti nisu sačuvani. Iza rata ponovni počeci kinološkog rada vezani su uz „Lovački savez“ pa je prva smotra pasa održana u Zagrebu 25. srpnja 1948, a 28. kolovoza 1948. osnovano je u Zagrebu „Kinološko udruženje Hrvatske“. Od 29. do 30. listopada 1949. održana je u Zagrebu „Prva državna izložba pasa svih pasmina“, a prijavljeno je bilo 350 pasa i 38 pasmina. 1950. godine osnovane su sekcije za ptičare, jamare, goniče i ne lovačke pse. Godine 1958. održan je u Zagrebu prvi ispit rada službenih pasa po pravilima FCI-ja. Nakon što je 1953. JKS preseljen iz Ljubljane u Beograd, tamo se centralno vodila rodovna knjiga za sve tadašnje republičke kinološke saveze, a od 1969. „Kinološki savez Hrvatske“ počeo je voditi paralelno svoju rodovnu knjigu za sve pasmine na svojem području (HKS, 2019).



Slika 2. Logo Hrvatskog kinološkog saveza (HKS, 2019).

Dana 24. ožujka 1991. donesena je odluka o promjeni naziva, pa se „Kinološki savez Hrvatske“ od tog dana zove „Hrvatski kinološki savez“ (HKS) te je 5. rujna 1992. HKS primljen na skupštini FCI-ja u Zürichu kao pridruženi član. Godišnja skupština FCI-ja u Bruxellesu jednoglasno je 30. svibnja 1995. primila Hrvatski kinološki savez u punopravno članstvo (Slika 2). Od 8 do 10. lipnja 2007. „Hrvatski kinološki savez“ organizirao je Europsku izložbu pasa u Zagrebu (Euro Dog Show). To je prva izložba te veličine na našim prostorima. Na toj izložbi kao najljepši pas izložbe (engl. Best In Show - BIS) pobjeđuje ženka pasmine njemačka doga imena Sun Della Baia Azzurra (Slika 3).



Slika 3. Najljepši pas izložbe Euro Dog Show 2007 - Sun Della Baia Azzurra (HKS, 2019).

2.3 Ovčarski i pastirski psi

Ovčarske i pastirske pasmine pasa razlikuju se izgledom i temperamentom. Međutim, svi oni imaju zajedničku prošlost – a to je čuvanje i zaštita naših predaka i njihovih stada te pomaganje pastirima i poljoprivrednicima – ali nemaju zajednički izvor.



Slika 4. Štenci tornjaka na straži (arhiva fotografija Lorene Kovačiček).

U pastirske pse (engl. livestock guardian dog - LGD) pripadaju psi velikih pasmina, često visoki i oko 70 cm u grebenu i teški više od 45 kg. Pastirski psi koriste se za čuvanje stoke od divljih predatora u odsutnosti ljudskog pastira. Među te pse ubraja se otprilike 50 pasmina po njihovim fenotipskim odlikama, s glavnom razlikom u boji dlake (Linnell i Lescureux, 2015). Dugogodišnja praksa „transhumance“, polunomadskog načina života sa sezonskom migracijom ljudi sa stokom i psima između pašnjaka duž tradicionalnih ruta, omogućila je kontinuiran protok gena između pastirskih pasa (Ceh i Dovc, 2014). Genetsku

strukturu popularnih LGD-a prethodno je istraživalo nekoliko autora (Bigi i sur., 2015; Ceh i Dovc, 2014; Talenti i sur., 2018).

Čuvanje čovjekove nastambe ili gospodarstva prirodan je način ponašanja pasa. U delti između rijeka Eufrata i Tigrisa, u današnjem Iraku gdje su se naši preci počeli baviti zemljoradnjom i stočarstvom, čuvarska aktivnost pasa proširena je i na zaštitu stoke. Pastiri su otkrili da ako se psi odmalena podižu uz ovce, koze i stoku, oni se prema tim životinjama ponašaju kao prema pripadnicima svoga čopora (Slika 4). Ti su čuvari uskoro postali nezamjenjivi.

Krda i stada stoke u početku su bila malena i dok su biljojedi ostajali na okupu i pasli, psi su ih štitili od vukova i lopova. Međutim, kako se veličina krda ili stada povećavala, pojedine životinje trebalo je spriječiti da ne odlutaju. Mali i okretni psi koristili su se da zalutale životinje vrate u stado – to su postali ovčarski psi. Kad su se pastiri počeli sa svojim životinjama kretati na većim udaljenostima, razvila se još jedna skupina pasa: goniči stoke ili govedari. I jedni i drugi štitili su životinje i gonili ih naprijed. Zdepasti goniči stoke razvili su se za tjeranje goveda, dok su se manji i okretniji goniči stoke razvili za gonjenje ovaca i koza. Ti manji goniči stoke bili su preteča današnjih ovčarskih pasa.

Mastifi, nastali selektivnim uzgojem, krenuli su zasebnim, iako povezanim putem. Vojni stratezi uočili su njihove potencijale i pretvorili ih u ratno oružje. Štiteći stada i imovinu u pratnji vojske u pokretu, spremno su oponašali agresivne taktike svojih gospodara. Ti masivni psi rasprostrli su se diljem Europe i Azije, a s bojnih polja ušli su u sportske arene, najprije boreći se s drugim životinjama, a potom i međusobno.

Mnogi današnji planinski psi potomci su mastifa, a među njima su stočarske, čuvarske i borbene pasmine. Pravo podrijetlo mastifa i dalje je obavijeno velom tajne, no pretpostavlja se da su primitivni psi iz jugozapadne Azije dovedeni u današnji Tibet i tamo su povećani. Vojnici i trgovci potom su ih vodili dalje prema istoku u današnju Kinu i Japan, gdje su se parili sa psima tipa špic, pa su tako nastali preci današnjih pasmina šar pei, chow-chow, akita i tosa inu. Ostali su krenuli prema zapadu – engleski, francuski, pirinejski, španjolski, napuljski i sicilijanski mastifi svi su izravni potomci tih tibetskih masivnih pasa. I još su jednom uvijek aktivni Feničani zaslužni za širenje tih masivnih pasa po Europi, iako ih je zapravo rimska vojska prenosila cijelim svojim carstvom. Mastifi koji su čuvali stoku pratili su rimske legije preko Alpa u Švicarsku prije 2000 godina te za sobom ostavili pretke apencelskog, bernskog i entelbuškog psa i velike švicarske planinske pse te bernardinca.

Čuvanje stoke ostala je prvenstvena namjena pasa tipa mastif, no uzgajivačima goveda i svinja te mesarima bili su potrebni i robusni i okretni psi za zaštitu i za gonjenje stoke. Staroengleski ovčarski pas nekoć je bio izvrstan gonič stoke. Takvi su bili i korgiji i

švedski vallhund. U Njemačkoj su tu ulogu preuzeli veliki i standardni gubičar te rotvajler, dok se u Francuskoj današnji flandrijski govedar isticao kao tjerač stoke. U Australiji još uvijek velika krda stoke vode kelpie, australski govedar i različiti heeleri. Osim toga, čuvarske pasmine koje su još strože u obrani raširile su se iz Azije u Europu i Afriku. Neustrašivi grčki, albanski, ilirski i istarski ovčari razvili su se na Balkanu, a komondor i kuvasz u Mađarskoj. Drugdje u Europi ostali masivni čuvari – kuvas, kuvac, marema te pirinejski i tatranski planinski psi, uvijek bijeli da bi se razlikovali od vukova pljačkaša te da bi se stopili sa stadom – izviđaju po svojim gazdinstvima čuvajući njih, ali ne i ovce. Da bi im pomogli upravljati golemim stadima, pastiri su koristili pse ovčare kao što su puli, pumi, mudi, hrvatski ovčar, bergamasco i poljski nizinski ovčarski pas. U Portugalu još je uvijek čuvar estrelski planinski pas, dok portugalski ovčarski psi i dalje okupljaju stada.



Slika 5. Graničarski koli u ovčarenju (arhiva fotografija Alena Marekovića).

Na europskim ravninama nastavili su se razvijati pastirski psi za okupljanje stada, vjerojatno od čuvarskih pasmina. U Velikoj Britaniji su tako nastali ovčari – odnosno koliji. Graničarski koli ili engl. border collie i dan danas slovi za psa s najvišom radnom inteligencijom (Slika 5). Na sjeveru Europe psi skupljači stada razvili su se u Belgiji, Nizozemskoj, Francuskoj i Njemačkoj. Današnji picardieski ovčar, beauceron, briard, nizozemski ovčar, schapendoes i belgijski pastirski psi svi su rezultat novijeg selektivnog uzgoja radi poboljšanja njihovih pastirskih vještina i poslušnosti. Svestrani njemački ovčar koristio se za različite aktivnosti koje zahtijevaju kombinaciju poslušnosti i razumnosti. U Sjedinjenim Državama i Australiji australski ovčar i novozelanski huntaway najnovije su

pridošlice na listi pastirskih pasa. Hrvatska autohtona pasmina koja pripada pod ovčare je hrvatski ovčar (Slika 6).



Slika 6. Hrvatski ovčar (arhiva fotografija Alena Marekovića).

2.3.1 FCI grupa 1: Ovčarski i pastirski psi

Psi FCI grupe 1: Ovčarski i stočarski psi (Slika 7) prije su se puno više koristili kao čuvari stada i goniči stoke, a danas su to uglavnom službeni psi i psi za pratnju.



Slika 7. FCI Grupa 1: Ovčarski i stočarski psi. Slijeva nadesno to su: 1) kelpie, 2) belgijski ovčar, 3) šiperki, 4) hrvatski ovčar, 5) bošeron, 6) briard, 7) pirinejski ovčar duge dlake, 8) pikardijski ovčar, 9) pirinejski ovčar kratke dlake, 10) njemački ovčar, 11) bradati ovčar, 12) graničarski koli, 13) dugodlaki škotski ovčar, 14) kratkodlaki škotski ovčar, 15) staro engleski ovčar bobtail, 16) šetlendski ovčar, 17) velški korgi kardigan, 18) velški korgi pembrok, 19) komondor, 20) kivas, 21) mudí, 22) puli, 23) pumi, 24) bergamski pastirski pas, 25) maremano abruceški pastirski pas, 26) poljski nizijski ovčar, 27) podhalanski ovčar, 28) aireški ovčar, 29) rumunjski karpatski ovčarski pas, 30) rumunjski ovčarski pas mioritik, 31) južnoruski ovčar, 32) čehoslovački vučji pas, 33) slovački ovčarski pas, 34) katalonski ovčar, 35) majorški ovčar duge i kratke dlake, 36) bijeli švicarski ovčar, 37) nizozemski kovrčavi ovčar, 38) nizozemski ovčar, 39) sarlosov vučji pas, 40) australijski ovčar, 41) australijski govedar, 42) ardenski govedar, 43) flandrijski govedar (Google slike, 2019).

2.3.2 FCI Grupa 2: Pinčeri i šnaučeri – molosi i švicarski pastirski psi

U FCI grupu 2: Pinčeri i šnaučeri – molosi i švicarski pastirski psi (Slika 8) pripadaju pastirski psi, psi koji se koriste kao čuvari doma i borbeni psi. Tu se nalazi velik broj popularnih pasmina koje su danas uglavnom najbrojnije na izložbama.



Slika 8. FCI grupa 2: Pinčeri i šnaučeri – molosi i švicarski pastirski psi. Slijeva nadesno to su: 1) austrijski pinč, 2) dansko švedski stočarski pas, 3) majmunski pinč, 4) doberman, 5) pinč, 6) patuljasti pinč, 7) veliki šnaučeri, 8) patuljasti šnaučeri, 9) šnaučeri, 10) nizozemski pinč, 11) ruski crni terijer, 12) argentinski pas, 13) brazilski pas, 14) šar pei, 15) danski pas, 16) bordoška doga, 17) bokser, 18) njemačka doga, 19) rotvajler, 20) buldog, 21) bulmastif, 22) mastif, 23) cane corso, 24) napuljski mastif, 25) japanski mastif, 26) pas svetog Miguela, 27) majorški mastif, 28) kanaarski pas, 29) urugvajski kimaron, 30) tornjak, 31) newfoundlander, 32) pirinejski planinski pas, 33) hovavart, 34) leonberger, 35) landsir, 36) atlaski pastirski pas, 37) šarplaninac, 38) pastirski pas iz laboreira, 39) estrelski planinski pas, 40) alentejski mastif, 41) južnoistočno europski pastirski pas bucovina, 42) kavkaski ovčar, 43) srednje azijski ovčar, 44) kraški ovčar, 45) pirinejski mastif, 46) španjolski mastif, 47) bernardinac, 48) tibetski mastif, 49) kangal, 50) apencelski pastirski pas, 51) bernski planinski pas, 52) entleburški planinski pas, 53) veliki švicarski planinski pas (Google slike, 2019).

2.4 Povijest pastirskih pasmina pasa u Hrvatskoj, Makedoniji, Srbiji i Sloveniji



Slika 9. Kraški ovčar s lipicancima (KZS, 2019).

Kraški ovčar, šarplaninac i tornjak pasmine su priznate od FCI-ja koje pripadaju podgrupi LGD-a, a povezuju se s Balkanom po zemljopisnom podrijetlu i smatraju se moloserskim planinskim psima (Slika 9 i 10).



Slika 10. Tornjak i šarplaninci (arhiva fotografija Lorene Kovačiček).

Do danas FCI prepoznaje šest hrvatskih autohtonih pasmina pasa (dalmatinski pas, hrvatski ovčar, istarski kratkodlaki gonič, istarski oštrodlaki gonič, posavski gonič i tornjak), dok je naša nacionalna pasmina, međimurski mali pas, još uvijek nepriznata (HKS, 2019).

2.4.1 Opis pasmine kraški ovčar



Slika 11. Kraški ovčar (KZS, 2019).

Predak kraškog ovčara i šarplaninca vjerojatno je slijedio Ilire u svojim migracijama kroz Istru i dalmatinske otoke. Jedna populacija pasmine naselila se u slovenskom području kraškog masiva, a druga u masivu Šarplanina. Pasma se prvi put spominje 1689. godine u knjizi baruna Janeza Vajkara Valvasora „Die Ehre des Herzogtums Krain“. Standard je službeno priznat od strane FCI-ja 1939. godine pod imenom ilirski ovčar (FCI-Standard N ° 278).

Kraški ovčar (Slika 11) zvan je još i kraševac, brek, čič, istarski ovčar i ilirski ovčar i pripada pod FCI grupu 2, sekciju 2.2 molosi – planinski tip pod brojem 278 i jedina je za sada slovenska autohtona pasmina psa koju priznaje FCI.

Kraški ovčar je zapravo po podrijetlu, upotrebi i izgledu tipičan pastirski pas. Ime kraški ovčar navodi na pogrešan zaključak, ali kada je dobio to ime, nisu svi kinolozi razlikovali te dvije pasminske skupine, a i lakše je bilo reći „kraški ovčar“ nego „kraški pastirski pas“. Kako bi se izbjeglo pogrešno ime, kasnije ga je međunarodni kinološki sudac iz Slovenije i ljubitelj pasmine Miroslav Zidar preimenovala u „kraševac“, a taj se naziv i službeno upotrebljava od 2001.godine.

Kraševac se iz Istre i slovenske pokrajine Krasi (po kojoj i nosi ime) proširio po cijeloj Sloveniji. Prvi pisani izvori o kraškim ovčarima kao pastirskim psima sežu u 1558. godinu kad je ravnatelj ergele Lipica Franc Jurko zapisao da su kupili jake i oštre pse koji će paziti na uzgojne kobile. Baron i prvi slovenski enciklopedist Janez Vajkard Valvasor

spominje jake i neustrašive pse koje su uzgajali niz rijeku Pivku u svojoj knjizi „Slava vojvodine Kranjske“ još davne 1689. godine. U 19. stoljeću prof. Strebel spominje kraševca kao vezu između molosa i njemačkog ovčara.

Kraševac se prvotno zvao istarski ovčar, ali nakon Prvog svjetskog rata Istra je pripala Italiji, zato su ga slovenski kinolozi preimenovali u ilirskog ovčara. Nakon Drugog svjetskog rata ime ilirski ovčar upotrebljava se za dvije pasmine: šarplaninca i kraševca, što dovodi do nekih zabluda o pasmini. Kraški ovčar se poimence navodi u prvoj kinološkoj studiji koju je 1925. objavio Ivan Lovrenčič u časopisu Športni pes. Godine 1939. slovenski kinolog Teodor T. Drenig u Stockholmu predstavio je izvješće na temelju kojega je FCI prvi put međunarodno priznao ovu pasminu, međutim pod imenom ilirski pas. Ime kraški ovčar je tada napušteno zbog oporbe talijanskih kinologa jer je u to vrijeme Kras bio pod Italijom.

Drugi svjetski rat jako je smanjio broj kraških ovčara – preživjelo je tek nekoliko pasa. Zbog malog broja kraševaca i uskog genetskog grla, u populaciju je kroz godine umiješano nekoliko šarplaninaca i dva newfoundlandera. Bez obzira na to, zadnja genetska istraživanja očito odjeljuju kraševca od šarplaninca.

Priznavanje kraševca (ovog puta odvojenog od ilirskog ovčara) kao autohtone slovenske pasmine potrajalo je sve do 1968. godine. O tome je pisao Ivan Božič u Informatoru još 1980. godine: kraški ovčar bio je ponovo međunarodno priznat nakon 12 godišnjih mučnih i intenzivnih napora naših znanih kinoloških radnika, a to je postignuto izvanrednim naporima uzgajivača kraških ovčara... Miroslav Zidar je s Teodorom Drenigom i Janezom Hojanom izborio ponovo priznanje kraškog ovčara kao autohtone slovenske pasmine (KZS, 2019).

Važan dio za povijest pasmine ostvarili su i uzgajivači, a nakon rata bila je osnovana uzgojna-seleksijska stanica za kraške ovčare u Slovenskoj Bistrici, koju je vodio pokojni Ivan Kupčič, a nakon njega Ivan Božič, zatim bivši predsjednik društva Alojz Cilenšek, kao i Cirila Vitpotnik, Branka Sluga Krajnc i mnogi drugi volonteri. Danas tradiciju nastavlja ekipa volontera iz cijele Slovenije „Društvo ljubitelja i uzgajivača kraških ovčara Slovenije – DLVKOS“ (DVLKOS, 2019).

Godine 2008. procijenjena je veličina populacije kraških ovčara u Sloveniji narasla na 600 – 700 pasa. Nešto pasa ima i u Europi: Hrvatskoj, Italiji, Njemačkoj, Austriji, Nizozemskoj, Švicarskoj, no ipak je većina u Sloveniji. Sudeći po broju pasa uključenih u uzgoj - ova je pasmina na rubu izumiranja.

Kraševci su psi kod kojih ženka doseže 54 – 60 cm u visini, a mužjak 57 – 63 cm. Ženke su teške 25 –37 kg, a mužjaci 30 –42 kg. Boja kraševaca je željezno siva, svjetlija

prema trbuhu i nogama. Dlaka je dvostruka, gusta i imaju mekanu poddlaku koja se (jednom do dva puta u godini) linja i dugu, kostrijetastu pokrovnu dlaku. Kraševac je srednje velik, jak pastirski pas, sa spuštenim ušima i repom, bogato odlakan, željezno sive boje, obilne konstitucije, skladno građen i mišičav. Oči su mu bademaste, smeđe i dobro pigmentirane.

U Sloveniji se, iako to još nije obaveza, već godinama provodi DNA profiliranje kraškog ovčara. Cijela populacija kraškog ovčara je mala s obzirom da broji samo 800 pasa.

2.4.2 Opis pasmine tornjak

Naš jedini pastirski pas (LGD), tornjak, prvi se put spominje kao "Canis montanus" u 9. stoljeću u pisanim dokumentima Katoličke crkve (Nakić-Petrina, 2002). Tornjak je prvi put opisan u spisima đakovačkog biskupa Petera Horvata iz 1374. godine, a njegov opis odgovara i opisima Petra Lukića, kanona Đakovačke biskupije, napisanim 1752. (Nakić-Petrina, 2002; Špoljarić, 2008). Ime „tornjak“ potječe od hrvatske riječi tor, što znači ograđeno područje za držanje stoke (Špoljarić, 2008).



Slika 12. Sentinel the Croat (Wikidata, 2019).

U Državnom muzeju Ermitagea nalazi se slika "Sentinel the Croat" koju je 1854. godine nacrtao belgijski slikar Louis Gallait, na kojoj je prikazan hrvatski čovjek i pas poput tornjaka (Slika 12).



Slika 13. Tornjak Zogar All-Petrina's "Zogy" (arhiva fotografija Ljiljane Nakić-Petrine).

Tornjak (Slika 13) po službenoj nomenklaturi i podjelama od 2005. godine pripada u drugu FCI grupu 2: pinčeri i šnaučeri, molosi i švicarski pastirski psi, odsjek 2: molosi, pododsjek 2: planinski psi. To je najbrojnija od svih 10 FCI-jevih grupa pasmina. Ranije je tornjak godinama kao pasmina još uvijek nepriznata od FCI-ja (na izložbama po Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini) bio uvršten i izlagao se zajedno s drugim psima ovčarskih i pastirskih pasmina FCI grupe 1, i to od početka 80-ih otkako je prvi put uopće izlagan na izložbi pasa.

FCI je tornjaka, – bosanskohercegovačko-hrvatskog ovčarskog psa, privremeno prihvatio 2007. Standard tornjaka prihvaćen je 16/05/2007 pod brojem 355, a konačno je prihvaćen na definitivnoj osnovi od strane FCI-ja 2017. godine. Tornjak je prvotno imao dva podtipa (bosanskohercegovački i hrvatski podtip), ali je ta praksa kasnije opozvana. Danas je tornjak prepoznat kao autohtona pasmina Hrvatske i Bosne i Hercegovine (Slika 14).

Tornjaci su visine do 60 cm kod ženki, a 75 cm kod mužjaka. Težine su od 38 do 65 kg. Boja krzna tornjaka je bijela osnova s više ili manje neke druge boje. Obojanost može biti: crna, crna s paležom (trikolor), smeđa, medeno žuta, siva. Boje po krznu tornjaka može biti od vrlo malo, pa imamo gotovo posve bijelih tornjaka s nešto rijetkih obojanih točki, preko tornjaka s više ili manje "ploča" obojanosti, pa do tornjaka obojanih u "plaštu" koji prekriva cijelo tijelo osim vrha njuške, donjih dijelova nogu, vrha repa, prsiju, trbuha i

"ogrlice". Plašt može biti crn ili smeđ, a nekad su postojali i posve crni primjerci sa svijetlim obrazima, njuškom i paležom, no taj tip obojanosti (Garov) se na žalost izgubio. Narod je prema obojanosti krzna tornjaku davao i najčešća imena u pasmini: Šarov/Šara, Grivo/Griva, Grlin, Bilov, Medi/Medov, Garov... Dlaka je dvostruka, gusta i mekana s poddlakom. Bujno odlakan i kitnjast rep posebna je oznaka pasmine i tornjak ga u aktivnosti uvijek nosi nad razinom leđa.



Slika 14. Štenci tornjaka (arhiva fotografija Lorene Kovačiček).

2.4.3 Opis pasmine šarplaninac

Preci kraškog ovčara i šarplaninca bili su podvrste iste pasmine, ali su međunarodno priznati kao odvojene pasmine 1968. godine (Slika 15).



Slika 15. Šarplaninci (arhiva fotografija Nikoline Kovačević Ganić).

U mnogim publikacijama još se i danas mogu naći teze prema kojima je šarplaninac izravan potomak vuka s toga područja. Tu je tezu postavio još austrijski kinolog Laska prema kojem se šarplaninac dalje razvijao bez doticaja i izmjena gena sa srodnim psima drugih područja. Takva teza danas svakako više ne može naći znanstveno uporište, ali se ipak i dalje često prepisuje kada se govori o podrijetlu i nastanku šarplaninca, a uzimajući u obzir cjelokupno podrijetlo, razvoj i vremensku rasprostranjenost, dalo bi se zaključiti da bi povijest šarplaninca mogla biti stara okvirno 2000 do 3000 godina.

Šarplaninac je pasmina koja je dugo bila poznata kao jugoslavenska pasmina, odnosno pasmina bivše SFRJ. Međutim, šarplaninac nikad nije nastanjivao čitavo područje bivše Jugoslavije, nego isključivo područja Makedonije, Kosova, Srbije i Crne Gore, a izvorno stanište ovih pasa poznata je Šar Planina po kojoj je pasmina dobila i svoje ime i koja jednim svojim dijelom čini granicu između Srbije i Makedonije te se na sjeveru i sjeveroistoku proteže uzduž Kosova, Albanije i Crne Gore. Prostrana šumska područja Šar

Planine oduvijek su bila stanište krupnih zvjeri i divljači, ali i zbog mnogih bogatih pašnjaka idealno mjesto klasičnih oblika ovčarstva i kozarstva gdje je šarplaninac bio stoljećima korišten kao čuvar i zaštitnik stada i pastira. U vrijeme bivše Jugoslavije šarplaninac je dugo bio korišten i kao vojni i policijski pas.



Slika 16. Nero od Grobnika, mužjak pasmine šarplaninac (3 god.)
(arhiva fotografija Nikoline Kovačević Ganić).

Šarplaninac je postala rijetka pasmina nakon Drugog svjetskog rata i vjerojatno je pomiješana s nekoliko pasmina uključujući i kavkasko ovčare (FCI - Standard N° 41). Jedan od razloga je određena, rijetka, ali uvijek prisutna obojanost nekih šarplaninaca koja podsjeća upravo na kavkaskog ovčara. Drugi razlog je blizina područja koje izvorno nastanjuju i šarplaninac i kavkaski ovčar, kao i pojedini tipovi šarplaninaca koji sliče na stepski tip kavkaskog ovčara.

Jedan od prvih zapisa koji govore o psu u tipu današnjeg šarplaninca dao je Richard Strebel 1905. godine. Opis šarplaninca kao pasmine u to vrijeme još nije postojao te on govori o jednom "Istarskom ovčaru". Međutim, usprkos njegovom opširnom opisu, teško se moglo zaključiti da li se radi o psu u tipu šarplaninca ili kraškog ovčara. Godine 1939. pri FCI-ju je registrirana jedna pasmina pod imenom "ilirski ovčar". Prilikom registracije standard pasmine još uvijek nije bio priložen te je i dalje ostalo nejasno da li se radilo o šarplanincu ili kraškom ovčaru. Za vrijeme II. svjetskog rata većina je dokumentacije izgubljena, a i puno je ovih pasa izgubilo živote. Nakon rata, 1957. godine FCI je zatražio obnavljanje registracije, pa je te godine registrirana pasmina pod imenom "jugoslavenski ovčarski pas - šarplaninac." Dugo je izvoz šarplaninca izvan granica Jugoslavije bio

zabranjen. Tek 1970. godine jugoslavenske su vlasti ukinule tu zabranu i dopustile prodaju šarplaninca u zapadnu Europu i SAD (KSRS, 2019).

Prosječna visina odraslog mušjaka (Slika 16) kreće se od 70 do 75 cm, a ženki od 65 do 70 cm. Prosječna masa odraslog mušjaka kreće se od 50 do 60 kg, a odrasle ženke od 40 do 50 kg. Šarplaninci su veliki i snažni psi, snažne, mišićave i robusne građe, dugačke i guste pokrovne dlake. Boja pokrovne dlake obično je čelično siva, svijetlo bež, crna te prošarana svim nijansama sive. Ove boje gotovo nikad nisu oštro razgraničene, nego se obično prelijevaju difuzno jedna povrh druge. Za obojanost glave, odnosno raspodjelu boja na glavi često se zna koristiti izraz "mramoran". Oči su bademaste, svijetlo ili tamnosmeđe boje.

2.5 Drevne pasmine pasa

Domaći psi (*Canis familiaris*) sisavci su koji postoje u najviše različitih fenotipova. Jaka umjetna selekcija razvila je oko 450 svjetski priznatih pasmina. Čak se smatra da bi, kad bi se ubrojile i sve pasmine u nastajanju sa svih kontinenata, sveukupno bilo oko 1000 pasmina. Pasmine pasa razlikuju se po puno morfoloških osobina, uključujući veličinu tijela, oblik lubanje, fenotip repa, boju krzna i vrstu krzna. Oni također posjeduju različite osobine ponašanja, uključujući stočarstvo, čuvanje i lov, kao i osobine ličnosti kao što su agresivnost, smjelost ili hipersocijalno ponašanje. Pa ipak većina danas poznatih pasmina pasa razvijena je u posljednjih 200 godina, koristeći mali broj osnivača.

Drevna pasmina pasa bio je termin koji je nekada Američki kinološki savez (American Kennel Club - AKC) koristio za skupinu pasmina pasa. Te su se pasmine nazivale "drevnim pasminama", za razliku od modernih pasmina, jer se povijesno smatralo da imaju podrijetlo starije od 500 godina.

Autorica Parker i sur. (2004) provela je genetsko istraživanje kojim je utvrđeno da su najstarije pasmine pasa koje bismo mogli nazvati drevnima akita inu, aljaški malamut, basenji, čau-čau, šar pei, šiba inu i sibirski haski. Nakon njih u drugom koljenu slijede: afganistanski hrt, lhasa apso, pekinezer, saluki, samojed i tibetski terijer.

2.5.1 FCI grupa 3: terijeri

Iako su se mnogi jamari razvili u više europskih zemalja, većina svjetskih terijera potječe iz Velike Britanije. Njihovo ime potječe od riječi „terra“ što na latinskom jeziku znači zemlja. Svi su terijeri mladog postanka (Slika 17). Vrlo se malo spominju prije 1560. godine kad ih je britanski pisac dr. John Caius opisao kao prgave i oštre pse koji se mogu podnijeti jedino ako žive u staji (Fogle, 2007). Dok su jazavčari imali glatku, priljubljenu dlaku, terijeri što ih opisuje dr. Caius i drugi britanski pisci 18. stoljeća kao Thomas Bewick imali su oštru dlaku koja je obično bila crna s paležom ili riđa. Imali su uspravne uši i živahan temperament. Ove robusne i mišićave pse privlačila je sva divljač: lisice i jazavci, ali i štakori, lasice, tvorovi, vidre, svisci, miševi i zmije.



Slika 17. FCI grupa 3: Terijeri. Slijeva nadesno to su: 1) brazilski terijer, 2) njemački lovni terijer, 3) erdelski terijer, 4) bedlington terijer, 5) graničarski terijer, 6) foks terijer kratkodlaki, 7) foks terijer oštrodlaki, 8) lakeland terijer, 9) mančesterski terijer, 10) Parson Russel terijer, 11) velški terijer, 12) irski glen imalski terijer, 13) irski mekodlaki pšenični terijer, 14) irski terijer, 15) irski plavi terijer, 16) australijski terijer, 17) češki terijer, 18) kernski terijer, 19) dandie dinmont terijer, 20) Jack Russel terijer, 21) norfolški terijer, 22) norvički terijer, 23) škotski terijer, 24) silihamski terijer, 25) skajeski terijer, 26) zapadnoškotski bijeli terijer, 27) japanski terijer, 28) bul terijer, 29) mini bul terijer, 30) stafordski bul terijer, 31) američki stafordski terijer, 32) australijski svileni terijer, 33) engleski patuljasti terijer i 34) jorkširski terijer (Google slike, 2019).

Tijekom 19. stoljeća kratkonogi su terijeri, nošeni u torbama na sedlu, mogli pratiti lisičare u lovu. Nakon što bi goniči stjerali plijen u kut, puštali bi se terijeri koji bi okruženoj lisici zadavali coup de grace. Terijeri su jednako bili zadovoljni i kao pratioci na farmama tamaneći neželjene štetočine u gospodarskim zgradama. Vrsni i svestrani, korišteni su i u sportu, npr. jorkširski terijeri. U štakorskim jamama u Velikoj Britaniji i Irskoj vlasnici su terijerima mjerili vrijeme da bi vidjeli koliko štakora mogu ubiti. Drugdje su se terijeri, primjerice glen imalski, borili međusobno ili protiv drugih životinja na otvorenim poljima ili u

jamama. Pasmine za hajku na bikove prvobitno su bile veliki psi tipa mastif, a krv terijera dodana je da bi se pojačala njihova agresivnost, pa su tako stvoreni bul terijer, stafordski bul terijer i američki stafordski terijer. Bul terijera često prati najgori glas među pasminama pasa, no pouzdanom i vještom vlasniku taj pas nije opasniji od mnogih drugih pasmina iste veličine. Ono po čemu se pit bulovi razlikuju od drugih velikih i mišićavih pasmina jest njihova upornost. Kad ugrizu, ne puštaju. Kod radnih pasmina, kao što su velški i irski terijer, to se naziva srčanost. Čak i izložbeni psi moraju pokazati da su spremni napasti životinjsko skrovište.

Generički, izdržljivi i kratkonogi terijeri postoje diljem Velike Britanije i Irske, no u 19. stoljeću uzgajivači su počeli uzgajati tipove terijera pa su tako nastale regionalne varijante. U Škotskoj su to bili skyeski, škotski, sealyhamski, dandie dinmont i kernski terijeri. Bijeli kernski terijeri postali su poznati pod nazivom zapadno-škotski bijeli terijeri. Pasmine koje uključuju terijere paisley i clydesdale nestale su iako njihova krv vjerojatno kola venama jorkširskog terijera. Slične promjene dogodile su se i Engleskoj, Irskoj i Walesu pa je tako nastalo 29 britanskih pasmina koje i danas postoje. Mnogi od tih terijera, među kojima velški, irski, kernski plavi, foks i erdleski terijeri, potomci su lovačkih pasa i retrievera. Te se pasmine ne zavlache pod zemlju, već radije ganjaju, hvataju, ubijaju i donose plijen. Iako izvan Velike Britanije nišu što je zauzimaju britanski terijeri ispunjavaju jazavčari, minijturni šnaučeri, njemački, austrijski i majmunski pinčevi te nizozemski smoushond, britanske pasmine su se uvozile za stvaranje novih pasmina poput češkog terijera. Britanski terijeri su genetska baza japanskog terijera te australskog i australskog svilenkastog terijera. Terijerske pasmine još se uvijek razvijaju – one obuhvaćaju kromfohländera u Njemačkoj te masivne ruske crne terijere koji su primjer očajničke želje bivšeg Sovjetskog Saveza da stvara najbolje i najveće. Na drugom kraju spektra razvija se minijaturizacija – minijturni pinč, engleski patuljasti terijer, minijturni engleski bul terijer, brabancon i patuljasti foks terijer – što ukazuje na uspjeh terijera kao pasa za društvo.

2.5.2 FCI grupa 9: patuljasti psi i psi pratitelji

Arheološki nalazi iz Kine i srednje Europe pokazuju da se patuljasti rast, kod kojega je lubanja relativno velika, a duge kosti skraćene i zglobovi zadebljali, javljao prirodno u primitivnih pasa (Fogle, 2007). Patuljasti psi vjerojatno su se držali zbog svog neobičnog izgleda i preteča su današnjih kratkonogih pasmina – jazavčara i baseta. Pojavio se još jedan oblik smanjivanja – minijaturizacija – kod koje su svi dijelovi kostura jednako smanjeni (Slika 18). Ti oblici smanjivanja ponekad se odvijaju zajedno te tako nastaju pasmine poput pekinezera, najstarijeg poznatog psa za pratnju i psa kojeg su kineske carice nosile u rukavu još prije 2000 godina.



Slika 18. FCI grupa 9: Minijturni psi i psi pratitelji. Slijeva nadesno to su: 1) kovrčavi bišon, 2) maltezer, 3) bišon havanezer, 4) bolonjezer, 5) mali lavlji pas, 6) pudla, 7) belgijski grifon, 8) briselski grifon, 9) belgijski grifon kratkodlaki, 10) kineski kukmasti pas, 11) lhasa apso, 12) shih tzu, 13) tibetski španijel, 14) tibetski terijer, 15) čivava, 16) kavalir španijel kralja Charlesa, 17) španijel kralja Charlesa, 18) pekinezer, 19) japanski španijel, 20) kontinentalni patuljasti španijel, 21) ruski patuljasti pas, 22) kromfohrlander, 23) mops, 24) francuski buldog, 25) bostonski terijer (Google slike, 2019).

Pekinezer je vjerojatno srodan sa shih tzuom i malim tibetskim pasminama – lhasa apsom, tibetskim terijerom i tibetskim španijelom. Svi su oni bili i pastirski i stražarski psi, iako je tibetski španijel služio i kao talisman sreće putnicima, a tibetski terijer poklanjao se u znak zahvalnosti. Danas su te pasmine uglavnom kućni ljubimci, a njihova popularnost raste brže od većine drugih pasmina za društvo. U potrazi za novim i korisnim pasminama

pasa, stari Kinezi ovjekovječili su kineskog kukmastog psa, prvotno kao neobičnost, a potom i kao udoban termofor.

U Japanu je japanski španijel poprimio ulogu elitnog pratitelja aristokracije, a na kineskom kraljevskom dvoru to je bio pekinezer. Na drugoj strani svijeta sličan je pas, španijel, istu ulogu preuzeo na engleskom kraljevskom dvoru. Taj se pas toliko poistovjećivao s kraljem da mu je nadjenuto i njegovo ime: španijel kralja Charlesa. Poput svog bliskog srodnika kavalir španijela kralja Charlesa, ova pasmina nikad nije radila u polju, već je kralju i njegovim omiljenim prijateljima pružala društvo, ljubav i vjernost.

Engleski kralj nije jedini koji je držao male pse za pratnju. I u drugim dijelovima Europe mali bišoni bili su omiljeni pratioci na kraljevskim dvorovima. Bliski preci kovrčavog bišona, malog lavljeg psa, maltezera i bolonjezera u sličnim oblicima mogu se vidjeti na portretima pripadnika vladajuće klase u Portugalu, Španjolskoj, Francuskoj, Italiji i Njemačkoj. Pamučni pas pratio je žene francuskih službenika na Madagaskar, dok je bišon havanezer postao kućni ljubimac bogatih Talijana u Argentini, a kasnije i na Kubi. Čivave su jedinstveni pratitelji i osjetljivi stražarski psi. Nikad se nisu koristile kao terijeri za lov na štakore, iako su bile dovoljno velike i žustre osobnosti za obavljanje tog posla. One su čuvale meksičke hramove i njihova jačina nije bila u veličini, već u brojnosti. Mops i francuski buldog zapravo su smanjene verzije radnih pasa. Isto su se tako samo za društvo držali minijaturni, patuljasti i srednji pudli, a standardni pudli bili su i dresirani radni psi.

2.5.3 Opis pasmine tibetski terijer



Slika 19. Lena, ženka Lamleh linije pasmine tibetski terijer (2,5 god.).

Zbog nepovoljne klime i teškog terena u kojem je obitavala stoljećima, pasmina tibetski terijer (Slika 19) razvila je dvostruku dlaku, kompaktnu veličinu tijela, jedinstvena stopala i veliku okretnost. To je pas srednje veličine. Pola njegove lubanje čini glava, a pola njuška. Gledano sprijeda, oči su mu u sredini glave i moraju biti tamne i široko razmaknute, a rubovi očiju moraju biti tamni. Dlaka mu je vrlo gusta, ravna ili valovita, s kitnjastim repom uvijenim prema gore tako da mu pada preko leđa. Tibetski terijer dolazi u raznim bojama i raznim varijantama boje, uključujući bijelu, zlatnu, dvobojnu, trobojnu, brindle, srebrnu, crnu i još mnogo drugih varijanti. Zanimljivo je da tibetski terijeri mijenjaju boju dlake tijekom svog života, i to iz tamnije u svjetliju, ali i obrnuto (Slika 20). Tibetski je terijer kompaktna i ravnog držanja. Vrat je proporcionalan u odnosu na glavu i tijelo. Ramena moraju biti u blagom nagibu, mišićava i zabačena unazad. Prsa i prednje noge moraju biti jako obrasle dlakom. Noge su ravne i jake gledano sprijeda. Stopala tibetskog terijera su velika, plosnata i okrugla tako da izgledaju poput čizmica za snijeg. Stražnje noge su gusto obrasle dlakom i malo dulje od prednjih. Zglobovi su postavljeni nisko i nisu usmjereni ni prema unutra ni prema van (Mathiasen, 2006).



Slika 20. Rosie, štene tibetskog terijera.

Težina tibetskog terijera kreće se od 8 do 14 kg, dok je idealna visina između 35,6 i 40,6 cm, no tolerira se do 43 cm za mužjake, dok su ženke nešto niže. Genetski problemi kod tibetskih terijera koji se odražavaju na očima su progresivna retinalna atrofija (PRA), luksacija leće (LL), katarakt i CCL. No, ipak se radi o genetski prilično zdravim i otpornim psima te oni pripadaju među najdugovječnije pasmine. Dobri su penjači. Izrazito su osjetljivi na buhe budući da na nadmorskim visinama na kojima su živjeli u Tibetu buhe ne mogu živjeti i stoga nisu razvili otpornost na njih (Cunliffe i sur., 2006).

Tibetski terijer obiteljski je pas koji voli djecu i druge životinje. Jako su znatiželjni, a znaju biti i izrazito tvrdoglavi. Pripadaju među aktivne pse i stoga su dobar izbor za pseće sportove (tipa agility).

2.5.3.1 Tibetski terijer u Tibetu

Sam naziv pasmine kaže da su to psi s Tibeta, a radi se o jednoj od najstarijih pasmina na svijetu jer se prema legendi tibetski terijeri uzgajaju više od 2000 godina (Slika 21).



Slika 21. Tibetske pasmine u Tibetu (arhiva fotografija Ljiljane Vlašić).

Uzgojili su ih lame kao i neke druge tibetske pasmine poput tibetskog španijela te su bili vrlo cjenjeni. Tibetski terijeri držali su se kao srećonoše, maskote, psi čuvari, stočarski psi i psi pratitelji. Poznati kao "sveti psi Tibeta", tibetski terijeri nikada se nisu prodavali, nego su ih monasi poklanjali, i to obično u znak zahvalnosti.



Slika 22. Izvorna populacija Tibetskog terijera u Tibetu (arhiva fotografija Ljiljane Vlašić).

Izvorna populacija tibetskog terijera, još uvijek prisutna u Tibetu, predstavlja izvorni genetski bazen iz kojeg je samo nekoliko pojedinaca pridonijelo u ulozi osnivača zapadnoj populaciji tibetskog terijera (Slika 22). Osim toga, izvorna populacija tibetskog terijera također je pridonijela stvaranju genetskog bazena i nekih drugih tibetskih pasmina (Ihasa apso, shih tzu, tibetski španijel) koje se također smatraju drevnim pasminama pasa (Mathiasen 2006).

2.5.3.2 Tibetski terijer u zapadnom svijetu

Takozvana zapadna populacija tibetskog terijera potječe od malog broja osnivača koji su uvezeni iz Tibeta (Indija) početkom 20. stoljeća. Tijekom povijesti pasmine u zapadnim zemljama uspostavljene su dvije linije te pasmine.



Slika 23. Doktorica Agnes Grieg (Google slike, 2019).

Starija, Lamleh linija može se pratiti do prva dva psa [Bunti (Slika 24) i Rajah] koje je dr. Agnes Greig dobila 1922. u znak zahvalnosti što je spasila jedan život dok je radila u Indiji i dovela ih je sa sobom u Englesku 1930. godine (Slika 23).



Slika 24. Bunti (Google slike, 2019).

Engleski kinološki klub (The Kennel Club) priznao je 1937. tibetske terijere kao vlastitu pasminu na temelju životinja koje pripadaju Lamleh liniji.

Druga, Luneville linija tibetskih terijera nastala je od Duskyja, psa lutalice, kojeg je 1953. godine u Liverpoolu pronašao John Downey (Slika 25). Tada još nije bilo genetskih testova, stoga ne možemo sa sigurnošću reći je li taj pas doista bio čistokrvni tibetski terijer, pa ipak je kasnije pri Engleskom kinološkom klubu registriran kao tibetski terijer imena Trojan Kynos. Dusky i Princeza Aureus, ženka čije je porijeklo nejasno, tvore bazu Luneville linije tibetskih terijera (Cunliffe i sur., 2006).



Slika 25. Trojan Kynos (Google slike, 2019).

Obje linije tibetskog terijera iz populacije zapadnog svijeta potječu od vrlo ograničenog broja osnivača koji proizlaze iz populacije izvornih tibetskih terijera. Međutim, nakon što je zapadna populacija tibetskih terijera priznata od strane uzgajivača i klubova u Europi, Sjedinjenim Državama i Australiji, prošla je dugu i relativno strogu izolaciju od izvorne populacije u Tibetu. Ta se izolacija samo sporadično kršila zbog uvoza malog broja pojedinačnih pasa koji su privremeno osvježavali zapadnu populaciju pasmine. Posljedično tome, zapadna populacija tibetskih terijera ima vrlo posebnu situaciju, gdje zapadna populacija pod kontrolom pedigrea postoji paralelno s izvornom, autohtonom populacijom u Tibetu i tek je nedavno uspostavljen reproduktivni kontakt između obje populacije kroz ograničen broj uvezenih pasa iz Tibeta u zapadne zemlje. Zapadna populacija tibetskog terijera registrirana je 2017. pri FCI-ju pod Standardom pasmine br. 209 (Slika 26).



Slika 26. Zapadne linije tibetskog terijera na izložbi pasa (arhiva fotografija Ljiljane Vlašić).

2.6 Molekularni biljezi u populacijskoj genetici pasa

Populacijska genetika grana je genetike koji se bavi proučavanjem genetske strukture populacije, odnosno analizom učestalosti gena i genotipova u populacijama kao i čimbenicima koji ih određuju.

Brojne studije u posljednja dva desetljeća koristile su različite tipove genetskih biljega kako bi procijenile genetsku varijabilnost, heterozigotnost i filogenetske odnose između pasmina pasa (Plassais i sur., 2019). Osim na autosomalnu genomsku regiju, istraživanja su također bila usmjerena na Y kromosom (Ding i sur., 2011) i mitohondrijsku DNA (mtDNA) (Pang i sur. 2009).

2.6.1 Mikrosateliti

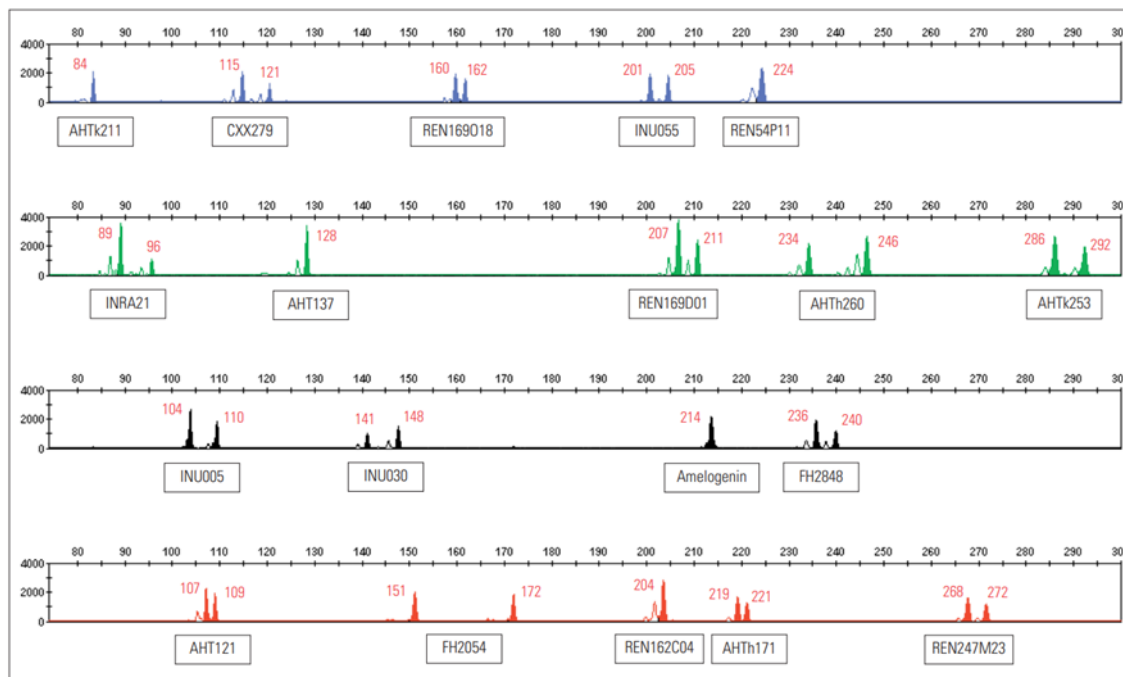
Prvi rezultati analiza genetske strukture populacija pasa i njihove filogenije kao i filogenetske udaljenosti između pasmina proizašli su iz studija na temelju mikrosatelitskih biljega (STR, engl. short tandem repeats). Mikrosateliti (STR) tandemska su ponavljanja određenih motiva DNA (koji se sastoje od dva do sedam parova baza), a koji se ponavljaju od pet pa čak i preko 100 puta. Mikrosateliti je moguće koristiti zbog njihove izrazite polimorfности.

Irion i sur. (2003) koristili su skup od 100 STR biljega kako bi razjasnili genetsku raznolikost među 28 pasmina pasa. Međutim, u tom eksperimentu STR biljezi nisu bili dovoljno informativni za uspostavljanje genetske povezanosti među psima unutar pojedinih pasmina. Snaga populacijskih analiza na temelju STR-a dokazana je u eksperimentu s 250 pasa gdje je već 10 mikrosatelitskih lokusa omogućilo 100 % identifikaciju podrijetla pasmine (Koskinen, 2003). Velika filogenetska studija provedena na 85 pasmina pasa pomoću 96 STR biljega pokazala je da razliku među pasminama čini 30 % genetskih varijacija (Parker i sur., 2004). U tom istraživanju filogenetska analiza omogućila je izdvajanje nekih pasmina drevnog podrijetla od pasmina modernog europskog podrijetla. Tibetski terijer, na primjer, bio je smješten u skupinu drevnih azijskih pasmina, blizu sivog vuka. STR analiza može se također koristiti za procjenu populacijskih parametara i za otkrivanje populacijskih događaja kao što su uska grla u prošlosti (Leroy i sur., 2009).

2.6.1.1 DNA profili

DNA profil (još zvan i DNA otisak, DNA testiranje ili DNA tipizacija) forenzička je tehnika koja se koristi za identifikaciju pojedinaca na osnovi mikrosatelita. To čini DNA profile jedinstvenima za svakog psa baš kao što je kod ljudi jedinstven otisak prsta. Modernu tehniku DNA profiliranja razvio je 1984. Sir Alec Jeffreys i otad se koristi u kriminalističkim

istragama, primjerice za dokazivanje očinstva kod ljudi, ali i u životinjskim i biljnim populacijama za populacijske studije.



Slika 27. Pseći panel za genotipizaciju upotrebom mikrosatelita 1.1 (Tom i sur., 2010).

Za DNA profile koristi se Thermo Scientific Canine Genotypes Panel 1.1 i on obuhvaća 19 takvih mikrosatelitnih lokusa: AHTk211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHT260, AHT253, INU005, INU030, Amelogenin, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHT171 i REN247M23 (Slika 27). Relativno nedavno dodaju se još 3 biljege u panel. Ti su biljezi uključeni u „glavni panel“ lokusa, a preporučeni su od "Odbora za primijenjenu genetiku kućnih ljubimaca – Međunarodnog društva za genetiku životinja" (International Society for Animal Genetics – ISAG). ISAG provodi godišnje testove usporedbe laboratorija i tada pošalju slijepe probe uzoraka za mikrosatelitnu analizu koje potom laboratoriji diljem svijeta analiziraju i svoj konačan rezultat pošalju u glavni, referentni laboratorij. Referentni laboratorij zatim, ovisno o točnosti analize, daje certifikat laboratoriju koji je proveo analizu. Taj se test provodi kako bi se dokazala točnost i sljedivost rezultata laboratorija i kako bi svaki DNA profil izrađen u laboratoriju s ISAG certifikatom bio iste vrijednosti i točnosti i usporediv s DNA profilima izrađenima u nekim drugim laboratorijima s ISAG certifikatom.

DNA profili u trenutku pisanja disertacije u Hrvatskoj nisu obavezni, no u nekim su europskim zemljama obavezni već dulje vrijeme. Primjerice, 'Slovenski kinološki savez

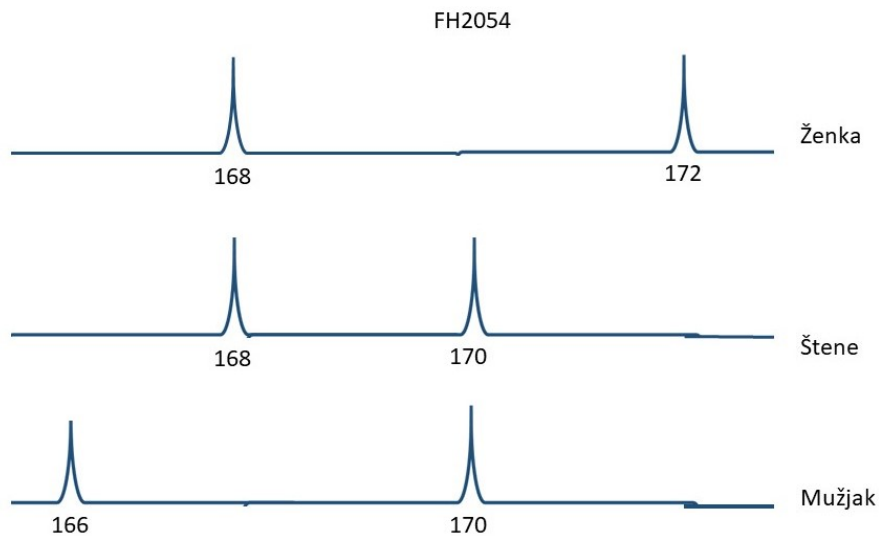
(Kinološka zveza Slovenije) donio je odluku po kojoj svi psi počevši od 1. rujna 2017. moraju imati izrađen DNA profil ako njihovi vlasnici žele sudjelovati u uzgoju.

Prije par godina Društvo ljubitelja i uzgajivača kraških ovčara Slovenije (DLVKOS) primijetilo je da se stalno, polagano ali sigurno, smanjuje genetska raznolikost te pasmine zbog malog broja pasa u uzgoju i prečestog korištenja malog broja istih popularnih parnjaka. DLVKOS se tada odlučio poduzeti hitne mjere zaštite. Ograničili su parenje pojedinih popularnih parnjaka, a povećali broj raspoloživih parnjaka (2005. godine ih je bilo oko 15, a 2011. taj broj narastao je na preko 100) i potražili su pse što manjeg srodstva. Također su započeli s programom informiranosti vlasnika kraških ovčara o važnosti uključivanja većeg broja ženki u uzgoj, surađujući sa Sveučilištem u Ljubljani, državom i širom javnosti. Od 2006. DLVKOS surađuje s Razredom za zootehniku Biotehničkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani na području genetskih istraživanja pod vodstvom prof. dr. sc. Petera Dovča. Od 2006. do 2011. DNA profilirano i genotipizirano je ukupno 400 kraških ovčara, a danas je taj broj već narastao na preko 800. Genetska istraživanja usmjerena su na dokazivanje podrijetla, izračun genetskih distanci i istraživanje povezanosti genetike s bolestima urinarnog trakta. U toj pasmini DNA profili odražuju se pri prijavi legla i rezultati DNA profila dodaju se u informacijski sustav DLVKOS-a za svako novo štene.

Namjena je informacijskog sustava (<http://www.dlvkos.si/>) koji se počinje stvarati 2008. godine pregledna i transparentna objava podataka i podizanje svijesti o važnosti odgovornog uzgoja kraškog ovčara. Sustav uključuje povijesne i aktualne podatke o kraškom ovčaru, a najstariji podatak datira čak iz 1920. U informacijskom sustavu možete naći rodovnike, podatke o potomcima, slike pasa, podatke o uzgojnim kombinacijama, leglima, parenjima, izložbama i slično. Vrlo je zanimljiv podatak o izračunu takozvane realne, stvarne, genetske distance između mužjaka i ženke kao i podatak o inbriding koeficijentu koji se može koristiti pri donošenju odluke o uzgojnim kombinacijama. Genetske distance i drugo izračunavaju se upravo na temelju izrađenih DNA profila. U sustavu možete pronaći i predizbor parnjaka prema kriteriju manje srodnosti, a poštujući i genetsku distancu. U tom predizboru vi možete upisati željenu majku i oca budućeg legla i vidjeti kako bi genetski izgledalo predviđeno leglo.

2.6.1.2 Dokazivanje očinstva

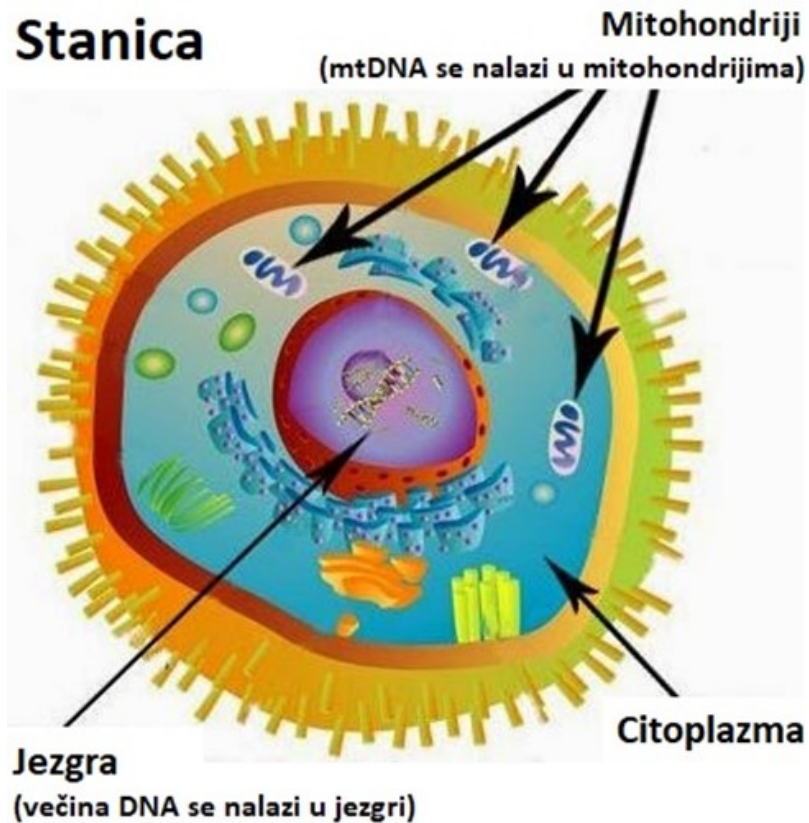
Kod testiranja roditeljstva izrađuju se DNA profili potencijalnih roditelja i potomka te se oni uspoređuju. U slučaju mikrosatelita koji se analiziraju DNA profilima, potomak nasljeđuje pola genetskih informacija od majke, a drugu polovicu od oca. Kod provjere roditeljstva svaki alel određen kod potomka trebao bi se poklapati sa alelom na istom lokusu kod jednog od roditelja kako bi se roditeljstvo potvrdilo (Slika 28).



Slika 28. Skica dokazivanja očinstva na psećem mikrosatelitnom lokusu FH2054. Prikazani su ženka, štene i mužjak. Pri analizi samo ovog lokusa u ovom slučaju to su potvrđeni majka i otac ovog šteneta budući da štene na lokusu FH2054 ima alel 168 naslijeđen od majke i alel 170 naslijeđen od oca. Da bismo stvarno potvrdili očinstvo, potrebno je analizirati 22 lokusa predložena od strane ISAG-a.

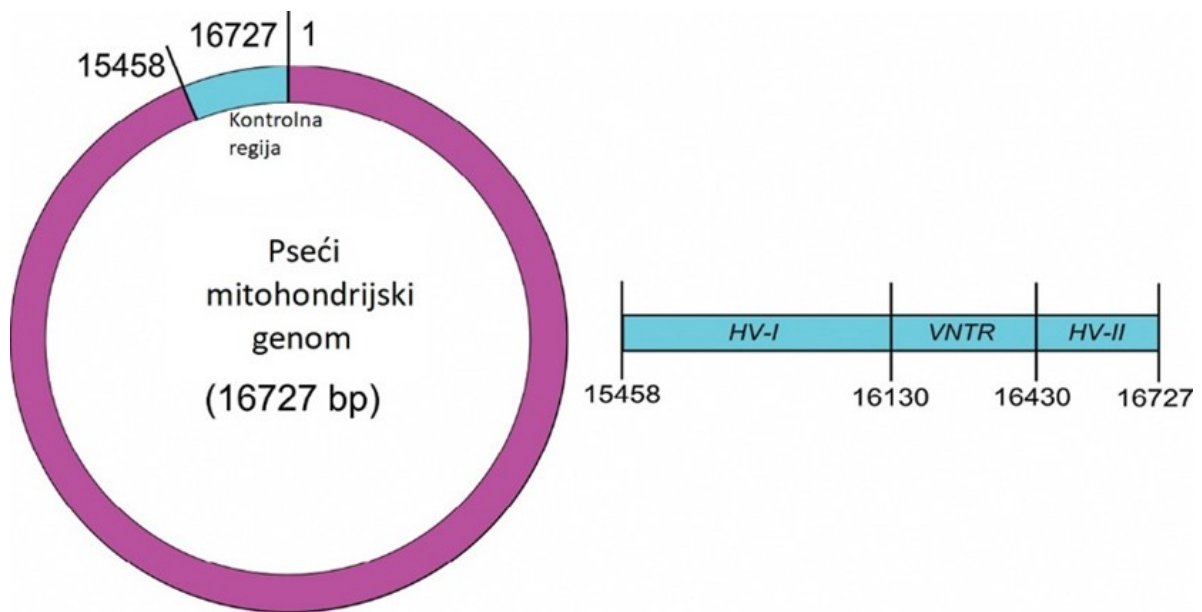
U slučaju potvrđenog majčinstva, svi biljezi koji nisu naslijeđeni od majke trebali bi biti naslijeđeni od oca. Za dokazivanje očinstva i/ili majčinstva dovoljna je usporedba DNA profila jednog roditelja i djeteta. Kod pasa analizira se najmanje 19 nasljednih mikrosatelitnih biljega preporučenih od ISAG-a koji su priznati kao dovoljno diskriminatorski, tj. koji daju vjerojatnost biološkog roditeljstva > 99,9 %. U slučaju da dođe do nepoklapanja biljega na samo jednom lokusu, očinstvo se isključuje. Testiranje roditeljstva može biti jako korisno za provjeru pedigreea, prilikom kupovanja životinje, u slučaju da znate majku ali niste sigurni tko je otac mladunaca, itd.

2.6.2 Mitohondrijska DNA



Slika 29. Prikaz eukariotske stanice i njenih glavnih staničnih organela i struktura – prilagođena slika (Google slike, 2019).

Mitohondrijska DNA (mtDNA) je deoksiribonukleinska kiselina koja se nalazi u mitohondrijima, staničnim organelama eukariotskih organizama koje se nalaze u citoplazmi i pretvaraju kemijsku energiju iz hrane u adenzin trifosfat (ATP) (Slika 29). Kod ljudi i većine životinjskih vrsta mtDNA se nasljeđuje samo po majci, zbog čega se preko mtDNA mogu pratiti preci po majčinoj liniji. Psi (*Canis familiaris*) također nasljeđuju mtDNA po majci, a dužina potpunog psećeg mitohondrijskog genoma (mitogenoma) je 16 727 baznih parova.



Slika 30. Pozicija nekodirane regije (CR) i njenih subregija u psećem mitogenomu (Kim i sur., 1998).

MtDNA kod psa koristi se najviše u populacijsko-genetičkim studijama za dokazivanje postanka vrste pas (*Canis familiaris*), odnosno kao objašnjavanje domestikacije pasa. MtDNA se koristi i u proučavanju sličnosti i različitosti unutar i između pasmina pasa. Osim u populacijsko-genetičkim studijama, mtDNA se često proučava i u arheološkim i forenzičkim studijama, kao identifikacija pojedinca. Za te potrebe analizira se regija mtDNA koja pokazuje veliku varijabilnost između pasa. To je područje nekodirajuće kontrolne regije (engl. „displacement loop“ ili „D-loop“) (Greenberg i sur., 1983). Kontrolna regija kod pasa duga je oko 1270 parova baza i sastoji se od dviju hipervarijabilnih regija: HV1 i HV2 (Kim i sur., 1998) (Slika 30).

Mitohondrijska DNA (mtDNA) kružna je molekula DNA sastavljena od 2 lanca: H-lanac (teški) i L-lanac (laki). Komplementarni lanci razlikuju se u sastavu; teški lanac bogat je purinskim (adenin i gvanin), dok je laki bogat pirimidinskim (timin i citozin) bazama. Ona čini manje od 1 % ukupnog DNA materijala organizma. Za razliku od jezgrine DNA, kod ljudi i većine životinjskih vrsta mtDNA potječe iz citoplazme oocite te se nasljeđuje isključivo po majčinskoj liniji, a očevi se mitohondriji odbacuju neposredno prije ulaska spermija u jezgru (Kondo i sur., 1990). Isključujući mutacije, sekvenca mtDNA identična je za sve majčinske pretke (Carracedo i sur., 2000). Jedini su izvor varijabilnosti mutacije koje se očituju u obliku SNP-ova (engl. Single nucleotide polymorphism), odnosno slučajnoj mutaciji jednog nukleotida.

Analiza mtDNA često se koristi u identifikaciji jedinki, bilo ljudi ili životinja, pogotovo kada je količina nuklearne DNA nedostatna. Glavna prednost analize mtDNA pred analizom nuklearne DNA jest velik broj kopija mtDNA po stanici. Uglavnom postoji nekoliko molekula mtDNA po mitohondriju i stotine mitohondrija u svakoj stanici. Ta činjenica povećava vjerojatnost dobivanja rezultata iz degradiranih DNA uzoraka poput kosti, dlake, zubi i fecesa (Pereira i sur., 2010). Analiza mtDNA danas se upotrebljava u populacijskoj genetici u istraživanjima domestikacije ljudi i životinja i evolucije pasmina, arheološkim istraživanjima (Savolainen i sur., 2002), forenzičkoj identifikaciji te identifikaciji posmrtnih ostataka ljudi.

Psi, kao i većina životinja, nasljeđuju mtDNA po majci. Dužina potpunog psećeg mitogenoma je 16 727 baznih parova (Kim i sur., 1998). Za identifikaciju taksona sisavaca koristi se analiza mtDNA biljega s malom varijacijom unutar i dostatnim varijacijama među taksonima, a to je često dio citokroma b ili citokroma c oksidaze podjedinice I (Linacre i Tobe, 2011). S druge pak strane, kako bi se analizom pseće dlake što točnije odredila specifična jedinka, potrebno je analizirati mtDNA regiju koja pokazuje visoku varijabilnost među psima. Studije koje analiziraju pseću mtDNA obično proučavaju nekodiranu kontrolnu regiju (CR) ili D-loop (Scharnhorst i Kanthaswamy, 2011) zbog visoke varijabilnosti. Kontrolna regija pasa duga je oko 1270 parova baza (Kim i sur., 1998). Unutar kontrolne regije nalaze se promotorske regije za transkripciju teškog i lakog lanca mtRNA. Osim toga, u sredini regije započinje sustav mapiranja kružnog mitogenoma koji se zatim nastavlja u smjeru kazaljke na satu, sve do zadnjeg nukleotida na 16 727. položaju.

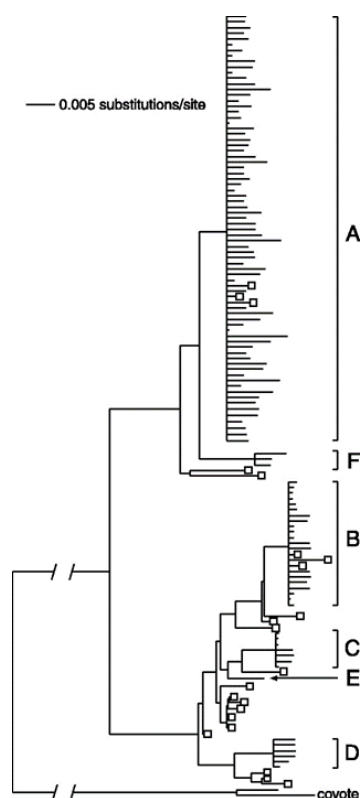
Unutar kontrolne regije postoje dvije hipervarijabilne regije: HV-I na položaju od 15 458 do 16 129 i HVII na položaju od 16 430 do 16 727 prema referentnoj sekvenci (Kim i sur., 1998). Između njih nalazi se varijabilan broj tandemskih ponavljanja (VNTR) s motivom od 10 baznih parova. HV-I i HV-II najčešće se analiziraju u forenzičke svrhe zbog svog visokog stupnja varijabilnosti, dok su VNTR često isključeni iz forenzičkih analiza zbog visoke razine heteroplazmije duljine (Fridez i sur., 1999).

Heteroplazmija duljine uzrokovana je proklizavanjem replikativnog polimeraznog kompleksa koji ne može vjerno replicirati duže VNTR-ove i kao rezultat nastaju dvije ili više subpopulacija mtDNA (nastanu različite varijante mtDNA haplotipova). Pretpostavlja se da je izvor mutacija oštećenje molekule DNA izazvano kisikovim radikalima koji se proizvode tijekom oksidativne fosforilacije (Yakes i Van Houten, 1997). Popravlak tog oštećenja stanica mitohondrija rješava mehanizmom izrezivanja baza, ali zbog visoke stope oštećenja taj mehanizam nije savršen i dolazi do mutacija. Upravo je to razlog što se heteroplazmijske varijante mtDNA nakupljaju tijekom života organizma. U praksi je frekvencija heteroplazmije

uglavnom jako niska jer se mutacije ne moraju nužno pojaviti na istom mjestu, već su raspoređene u heterogenim varijantama unutar i između tkiva, što znači i da ih je teže prepoznati pomoću standardnih tehnika sekvenciranja (Pereira et al. 2010).

Za svrhe usporedbe, budući da su brojne objavljene studije ograničene na regiju HV-I, haplotipovi CR-a koji su identični od pozicije 15 458 do 16 039 u odnosu na referentnu sekvencu (Kim i sur., 1998) grupirani su u CR haplogrupu (Verscheure i sur., 2013).

Webb i Allard (2009) bili su prvi autori koji su analizirali cijelu CR mtDNA. Kasnije Imes i sur. (2012) navode 71 polimorfizam jednog nukleotida (SNP) u CR-u pseće mtDNA koji omogućuju podjele na 10 čestih CR haplogrupa (A2, A11, A16, A17, A18, A19, A22, A26, B1 i C3), nazvanih po radu Savolainen i sur. (2002) (Slika 31). Proširenje sekvenciranja samo HV-I pozicije od 15 458 do 16 039 pseće mtDNA sa 71 SNP-om pojačalo je snagu diskriminacije analize pseće mtDNA. Vjerojatnost isključivanja, tj. vjerojatnost da dva slučajno odabrana uzorka iz iste populacije ne dijele isti haplotip, povećao se s 96 % na 99 % (Imes i sur., 2012).



Slika 31. Prikaz haplogrupe pseće mtDNA. Prikazano je šest grana psećih haplotipova (od A do F) i jedan haplotip kojota. Duljine grana u skladu su s navedenim razmjerima, dok je grana do kojota smanjena za 50 % (Savolainen i sur., 2002).

Verscheure i sur. (2013) pregledali su niz objavljenih radova populacijskih studija o CR-u pseće mtDNA koji pokazuju da iako je CR dovoljno polimorfan za forenzičku analizu, većina pasa ipak pripada jednom od nekoliko uobičajenih CR haplogrupa. Uspoređivali su

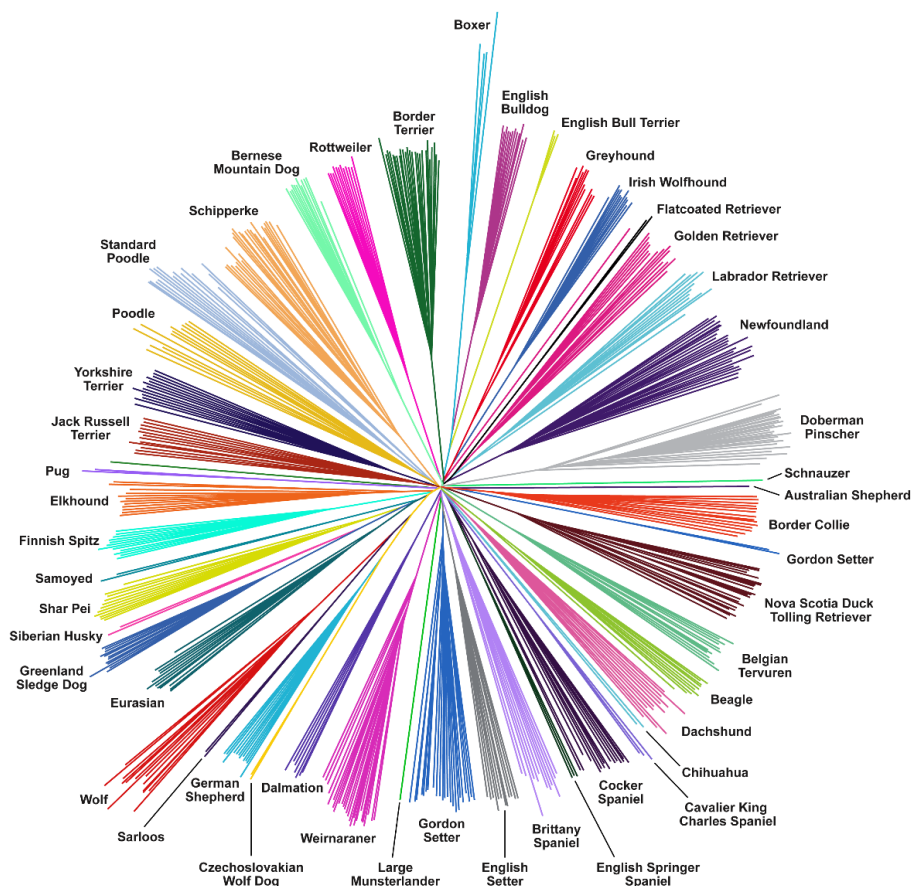
devet forenzičkih populacijskih studija iz Europe i SAD-a, pokazujući tri CR haplogrupe pod nazivima B1, A11 i A17 po Savolainen i sur. (2002) koje predstavljaju oko polovice uzorkovanih pasa s prosječnom frekvencijom populacije od 15,3 %, 15,2 % i 11,5 %. Budući da česti ili uobičajeni haplotipovi imaju veću vjerojatnost da su podijeljeni slučajno, mogu imati manju forenzičku vrijednost i tako smanjiti snagu diskriminacije pseće mtDNA. Stoga je preporučeno analizirati i HV-II regiju kako bi ona podijelila česte HV-I haplotipove u dodatne haplotipove.

2.6.2.1 Majčine linije

Imes i sur. (2012) odredili su 71 SNP u CR-u pseće mtDNA koji je dijele na šest glavnih CR haplogrupa (A, B, C, D, E i F) nazvanim po Savolainen i sur. (2002). Haplogroupe A, B i C sadrže 95 % svih haplotipova i pojavljuju u cijelom svijetu, izuzev Amerike za haplogrupe B i C (Pires i sur., 2006; Verscheure i sur., 2013). Prema Pang i sur. (2009) haplogrupe D, E i F nalaze se samo regionalno – moguće je da do toga dolazi zbog križanja s vukovima. Haplogrupa E javlja se u Jugoistočnoj Aziji, Koreji i Japanu, pa je moguće da potječe od ranih procesa pripitomljavanja pasa zajedno s haplogrupama A, B i C, ali se nije raširila na istoku Azije kao i ostale haplogrupe. Haplogrupa F javlja se kod pasa uzorkovanih u Japanu. Čini se da haplogrupa D potječe od dviju različitih populacija vuka budući da je pronađena jedna podhaplogrupa samo kod pasa sa sjevera Skandinavije, a druga podhaplogrupa kod pasa iz jugozapadne Azije, Sjeverne Afrike i Iberskog poluotoka.

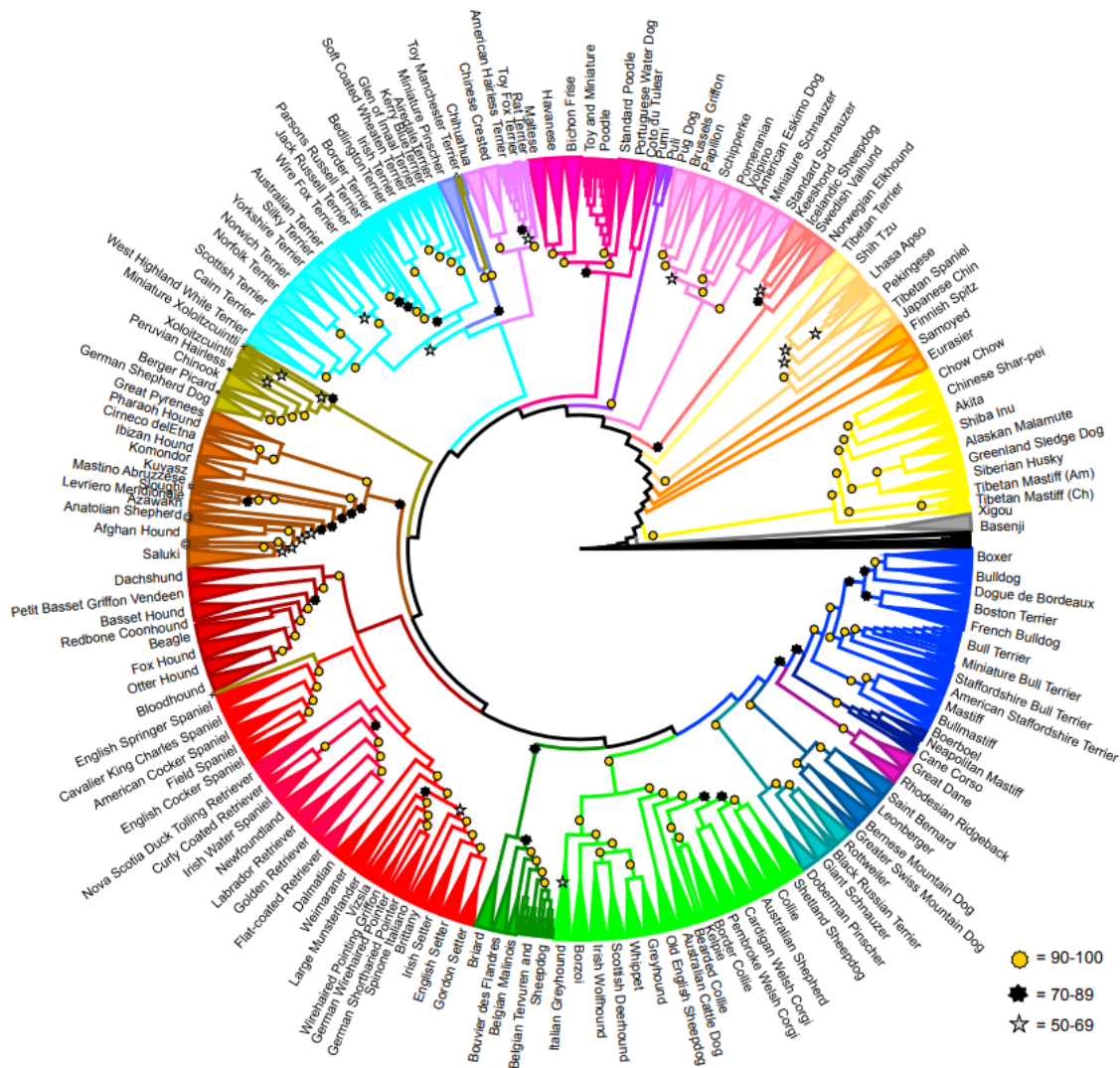
2.6.3 Genotipizacija polimorfizama jednog nukleotida na genomu (SNP)

Dostupnost cjelovite sekvence genoma pasa omogućila je identifikaciju velikog broja polimorfizama pojedinih nukleotida (SNP) i otvorila novi horizont za primjenu molekularnih biljega u genetičkim istraživanjima pasmina pasa (Lindblad-Toh i sur., 2005). To istraživanje otkrilo je važnost haplotipova velikih udaljenosti u čitavom psećem genomu, odražavajući prirodu genetske raznolikosti unutar i između pasmina pasa. Na temelju SNP analize Boyko i sur. (2010) uspjeli su identificirati 51 genomsku regiju psa povezanu u 57 svojstava. Analiza 509 pasa iz 46 pasmina otkrila je 44 genomske regije povezane s fenotipskim osobinama koje se razlikuju između pasmina (Vaysse i sur., 2011) (Slika 32).



Slika 32. Neighbor-joining stablo konstruirano iz sirovih podataka genetskih distanci koje predstavlja odnose između uzoraka (Vaysse i sur., 2011).

Nedavno je otkrivena genetska pozadina seoskih slobodnoživućih pasa i pasa srednjoazijskog podrijetla, gdje su geografska izolacija, migracija i hibridizacija identificirane kao važni čimbenici koji oblikuju genetsku raznolikost u populacijama seoskih pasa (Shannon i sur., 2015). Analiza dijeljenja haplotipova na razini genoma otkrila je zemljopisne obrasce razvoja i neovisno podrijetlo uobičajenih obilježja (Parker i sur., 2017) (Slika 33).



Slika 33. Kladogram 161 pasmine pasa (Parker i sur., 2017).

Nalazi istraživanja temeljeni na genomskim SNP nizovima podržani su i postupkom sekvenciranja cijelog genoma. Snaga panela za genotipizaciju 321 SNP- a za identifikaciju doprinosa različitih pasmina genetičkom sastavu pasa nepoznatog podrijetla razvijena je korištenjem DNK baze podataka koja je otkrila potpise pasmina. Kada je taj panel testiran na psima koji su živjeli u skloništima, ta metoda pokazala je mnogo bolju rezoluciju od fenotipskih testova koje je obavljalo osoblje skloništa (Gunter i sur., 2018).

2.6.3.1 Određivanje pasmine genotipiziranjem

Znanstvenici s Broad Instituta (Harvard, SAD) 2005. godine objavili su trenutni skup psećeg genoma, CanFam2.0. Projekt sekvenciranja psećeg genoma proizveo je visokokvalitetan nacrt genoma bokserice po imenu Tasha. Tashin genom korišten je kao

sekvenca za usporedbu podataka s drugim ključnim pasminama (Lindblad-Toh i sur., 2005). Iz tih usporedbi identificirano je preko 2,5 milijuna visokokvalitetnih SNP-ova.

CanineHD Genotyping BeadChip sadrži više od 170 000 biljega postavljenih na referentnu sekvencu CanFam2.0. Illumina je razvila BeadChip u suradnji s konzorcijem LUPA koji uključuje 22 europska sveučilišta i druge partnere, poput Broad Instituta. CanineHD BeadChip omogućava ispitivanje genetske varijacije u bilo kojoj pasmini pasa svojim visokim polimorfnim SNP sadržajem i pružanjem ujednačene genomske pokrivenosti. Pseći BeadChip predstavlja prosjek s više od 70 biljega po megabazi (Mb), pružajući dovoljnu gustoću SNP-ova za robusna populacijska međupasminska istraživanja kao i istraživanja o varijacijama broja kopija (CNV). Pored toga, haplotipovi među pasminama pasa kreću se u rasponu od 10 do 100 kb, sugerirajući da se genetski faktori rizika vjerojatno dijele među pasminama. Gusti set biljega CanineHD povećava sposobnost otkrivanja signala za svojstva koja se dijele među pasminama i za faktore rizika.

Sadržaj SNP-ova na CanineHD BeadChipu izabran je iz seta od 2,5 milijuna SNP-ova iz projekta "Dog Genome". Pored toga, identificirano je 1696 SNP-ova korištenjem metode ciljanog resequenciranja na temelju hibridizacije koja pronalazi SNP-ove unutar praznina u SNP mapi. SNP-ovi su odabrani tako da predstavljaju što je moguće više različitih pasmina, a da pritom održavaju pokrivenost od otprilike 70 SNP-ova po 1 Mb.

Napredak u psećoj genomici omogućio je pojavu komercijalnih genetskih određivanja pasmina, nudeći na taj način i identifikaciju mješavine pasmina kod mješanaca. Lindblad-Toh i sur. (2005) izvijestili su o prvom genomskom nacrtu sekvenciranja domaćeg psa zajedno s mapiranjem dva i pol milijuna polimorfizama jednog nukleotida (SNP). Koskinen (2003), Irion i sur. (2003) te Parker i sur. (2004) uspješno su dodijelili čistokrvne pse vlastitim pasminama genotipiziranjem različitog broja mikrosatelita. Boyko i sur. (2010) koristili su 915 DNA uzoraka pasa iz 80 pasmina (kao i nekoliko divljih vrsta kanida) kako bi identificirali relativno mali broj gena velikog učinka koji su odgovorni za fizičke osobine kao što su veličina tijela, duljina dlake, tip uha i duljina njuške. Sličnom genotipizacijom bavili su se i Vaysse i sur. (2011). Takva su istraživanja vrlo važna obzirom na relativno nedavno podrijetlo pasmina pasa i omogućavaju klasifikacije po grupama u odnosu na pseću populaciju baziranu na genetskoj varijaciji, a ne samo na njihovu ulogu u društvu ili na njihov fizički izgled odnosno fenotip. Gunter i sur. (2018) uspoređivali su vizualnu identifikaciju pasmine od strane osoblja skloništa San Diego Humane Society & SPCA (SDHS) u San Diegu, Kalifornija, s identifikacijom pomoću DNA genotipizacije, pri čemu je osoblje skloništa uspješno identificiralo barem jednu pasminu kod 67,7 % testiranih pasa,

međutim njihov je odgovor pao na 10,4 % kada je zatraženo da se identificira više pasmina u određenom uzorku.

2.6.3.2 Inbriding i efektivna veličina populacije

Prilikom genetskog vrednovanja životinja treba uzeti u obzir genetske korelacije između svojstava pod selekcijom (npr. otpornost na bolesti ili prilagođenost oštrim uvjetima okoline). Stohastički (slučajni) procesi, pogotovo genetski drift (genetski pomak), odgovorni su za slučajno variranje frekvencije alela iz generacije u generaciju. U velikoj populaciji u kojoj se životinje slučajno pare genetski drift nema velikog značenja. Međutim, kada je efektivna veličina (N_e) populacije mala, drift ima velik utjecaj na frekvencije alela iz generacije u generaciju, čak toliko da se u populaciji može fiksirati nepoželjan, odnosno izgubiti poželjan alel u vrlo kratkom vremenskom razdoblju. Posljedica je male efektivne veličine populacije i povećan inbriding (parenje jedinki u srodstvu) koji ne mijenja frekvenciju alela, već frekvenciju genotipova. Inbriding povećava frekvenciju homozigotnih genotipova, tj. smanjuje frekvenciju heterozigota, čime smanjuje genotipsku varijabilnost bez promjena u frekvenciji alela. Nakon nekog vremena te promjene mogu čak rezultirati povećanim fitnessom jer su recesivni aleli, koji su prije bili prikriveni u heterozigotnom stanju i tako zaštićeni od selekcije, sada izloženi selekciji (purging).

Inbriding je po definiciji parenje jedinki u srodstvu, odnosno jedinki koje imaju zajedničko podrijetlo (Falconer, 1989). Inbriding se određuje u odnosu na neku „osnovnu“ populaciju koju čine jedinke koje nisu u srodstvu (Ballou, 1983). To su uglavnom jedinke za koje nisu dostupne informacije o precima, pa se pretpostavlja da nemaju zajedničke pretke.

Jedinke koje dijele zajedničkog pretka mogu nositi alele na nekom lokusu koji su kopija jednog te istog alela iz prethodnih generacija te su tada ti aleli identični po podrijetlu („identical by descent“; IBD), a jedinke koje na nekom lokusu nose dva alela identična po podrijetlu (IBD) nazivamo autozigotima (Falconer, 1989). No, postoje i aleli identični po stanju („identical by state“; IBS) koji nisu potekli od zajedničkog pretka. Svi aleli identični po podrijetlu (IBD) ujedno su i identični po stanju (IBS), ali svaki alel identičan po stanju (IBS) ne mora biti i identičan po podrijetlu (IBD).

Koeficijent inbridinga (F) mjeri upravo vjerojatnost da su dva alela prisutna na nekom lokusu identična po podrijetlu (IBD), odnosno da su nastala replikacijom jednog alela zajedničkog pretka (Ballou, 1983). Vrijednosti koeficijenta inbridinga kreću se od 0 do 1 pri čemu jedinke koje nisu u inbridingu nose koeficijent 0, a one koje su u potpunosti autozigotne – koeficijent 1. Koeficijent inbridinga osnovne, bazne populacije po definiciji je 0 (Ballou, 1983). Ako pretpostavimo nasumično parenje u svim generacijama, tada je F

potomaka vjerojatnost da dvije nasumično odabrane gamete iz roditeljske generacije nose identičan alel na nekom lokusu. To je ujedno i prosječan koeficijent inbridinga svih potomaka, koji se promatra kao mjera disperzivnog procesa. Koeficijent inbridinga (F) važan je parametar koji daje uvid u razinu inbridinga u nekoj populaciji i razumijevanju djelovanja istog. Posljedica djelovanja inbridinga povećanje je homozigotnosti populacije, to jest povećanje frekvencije homozigotnih genotipova i smanjenje frekvencije heterozigota.

Povećanje homozigotnosti populacije može se smatrati štetnim, no isto se tako često iskorištava u proizvodnji homozigotnih linija koje nose neko poželjno svojstvo te u proizvodnji linija za znanstvena istraživanja kod kojih je poželjno da su jedinke genetički istovjetne.

Negativni su učinci inbridinga smanjenje genetskih vrijednosti za svojstva fitnesa, kao što su zdravlje, plodnost i životni vijek, te pojava inbriding depresije. Inbriding depresija je redukcija prosječne fenotipske vrijednosti populacije prikazana pokazateljima povezanim s reproduktivnim kapacitetom ili fiziološkom učinkovitošću, na primjer veličina legla i laktacija. Javlja se zbog toga što nepoželjni geni koji nisu izraženi u heterozigotnom stanju (jer su recesivni) postaju izraženi kada su paru s identičnom kopijom (homozigotno stanje). Inbriding depresija je sveprisutna pojava koja se promatra u gotovo svim populacijama uključujući i ljude (Wright, 1977; Pirchner, 1985; Falconer i Mackay, 1996). Kod pasa jedan od prvih radova o inbriding depresiji je rad o inbriding depresiji islandskih ovčara (Ólafsdóttir i Kristjansson, 2008). Kako bi se izbjegla pojava inbriding depresije, potrebna je točna i osjetljiva procjena inbridinga. Hibridni vigor ili heterozis pozitivna je pojava koja iskorištava djelovanje inbridinga na način da se parenjem jedinki koje su u potpunosti u inbridingu dobivaju potomci s većom genetskom vrijednosti. Inbriding depresija može se smanjiti ili čak potpuno izgubiti ako se nepoželjni recesivni aleli očiste (purging) iz populacije selekcijom protiv recesivnih homozigota u prijašnjim generacijama (Crnokrak i Barrett, 2002; Gulisija i Crow, 2007). Koeficijent inbridinga može se izračunati samo preko pedigrea ili upotrebom molekularnih biljega i pedigrea.

Preko SNP-ova moguće je odrediti homozigotne odsječke („Runs of Homozygosity“ ili ROH-ove) te na taj način procijeniti autozigotnost, odnosno procijeniti koliki je dio genoma identičan po podrijetlu. ROH-ovi su kontinuirani odsječci homozigotnih genotipova bez heterozigotnosti u diploidnom stanju. Smatra se da je glavni uzrok njihova nastajanja inbriding te su stoga dobar alat u procjeni razine inbridinga, posebice kad nije dostupan pedigree (Broman i Weber, 1999). Po dužini homozigotnih odsječaka moguće je odrediti i kad se inbriding dogodio. Dugački homozigotni odsječci govore u prilog nedavnom inbridingu, dok kraći homozigotni odsječci upućuju na davni inbriding. Očekivana dužina

ROH-ova prati eksponencijalnu distribuciju s prosjekom od $\frac{1}{2}g$ Morgana, gdje je g broj generacija od zajedničkog pretka (Howrigan i sur., 2013). Na uzorku od preko 2000 pasa Sams i Boyko (2019) preko SNP-ova i ROH-ova otkrivaju obrazac inbridinga i njegovo značajno preklapanje s genotipovima recesivnih bolesti kod domaćih pasa

Vrijednosti koeficijenta inbridinga iz ROH-ova ovise i o samom načinu postavljenih parametara kod određivanja ROH-ova. Tako primjerice gustoća SNP čipova koji se koriste u određivanju ROH-ova te daljnje manipulacije sa SNP-ovima (čišćenje SNP-ova s niskom frekvencijom rjeđih alela, onih koji odstupaju od Hardy-Weinbergove ravnoteže i onih koji pokazuju visok LD (engl. linkage disequilibrium) mogu utjecati na rezultate. Također je važno uzeti u obzir i greške genotipizacije SNP-ova, bilo da su heterozigotni SNP-ovi pogrešno genotipizirani kao homozigotni ili obrnuto (Ferenčaković i sur., 2013).

Prednosti su određivanja inbridinga preko ROH-ova nasuprot određivanju iz pedigreea te da inbriding određen iz ROH-ova uzima u obzir i inbriding bazne populacije za koju se inače smatra da nije u inbridingu, stohastičku prirodu rekombinacije i selekciju. Također se u određivanju inbridinga uz pomoć ROH-ova izbjegavaju česte pogreške koje se javljaju u pedigreeima radi krive interpretacije, krive identifikacije i netočnih zapisa.

Efektivna veličina populacije (N_e) temeljni je kriterij za utvrđivanje statusa ugroženosti populacija domaćih životinja. Ona je u korelaciji s inbridingom izračunatim bilo iz pedigreea ili molekularnim putem i formula za izračun efektivne veličine populacije preko inbridinga je:

$$N_e = \frac{1}{2\Delta f}$$

Pri čemu je N_e , efektivna veličina populacije, a Δf , stopa inbridinga.

3 MATERIJALI I METODE RADA

3.1 Strategija uzorkovanja i korišteni podaci

Uzorkovano je 50 tornjaka, 50 šarplaninaca, 200 kraških ovčara i 64 tibetska terijera (24 tibetska terijera zapadnih linija – 22 Lamleh i 4 Luneville linije; 22 tibetska terijera iz izvorne linije, osam tibetskih terijera F1 generacije križanja izvornih pasa sa Lamleh linijom, šest BC1 pasa povratno križanih F1 generacije s Lamleh linijom i 4 BC2 pasa povratno križanih BC1 s Lamleh linijom) (Slika 34).

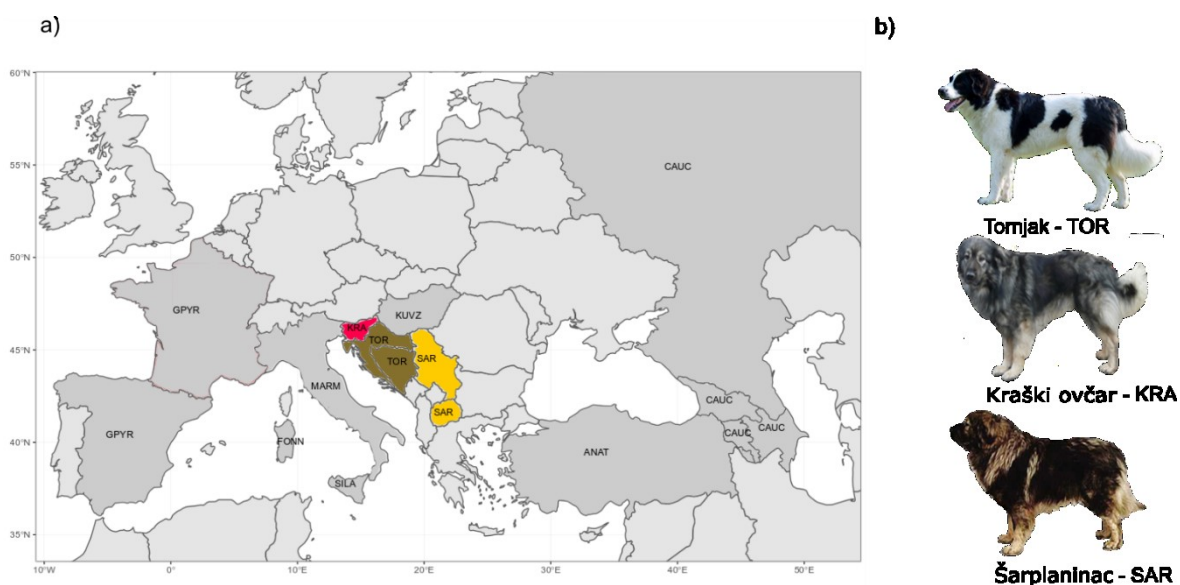


Slika 34. Uzorkovanje tornjaka.

Za rad o kraškom ovčaru, tornjaku i šarplanincu korišteno je 256 uzoraka pasa 23 pasmine i sedam uzoraka apeninskih vukova iz rada od Talenti i sur. (2018) i 1346 uzoraka pasa iz 161 pasmine iz rada od Parker i sur. (2017), dok je za rad o tibetskim terijerima korišteno 5406 uzoraka pasa iz 163 pasmine nukleotidnih sljedova iz istraživanja Shannon i sur. (2015) dostupnih u repozitoriju Dryad. Broj pasa po pasminama varirao je od 1 do 732.

3.1.1 Prikupljanje uzoraka dlake

Dlaka je skupljena na izložbama, kinološkim utakmicama ili direktno od uzgajivača ili vlasnika pasa. Uzorci su nasumično uzeti s različitih geografskih područja (Makedonija – šarplaninci, Bosna i Hercegovina – tornjaci, Hrvatska – tornjaci i tibetski terijeri, Slovenija – kraški ovčari i tibetski terijeri i Tibet – tibetski terijeri) (Slika 35). Uzorci izvornih tibetskih terijera prikupljeni su na 22 lokacije u Tibetu. Identifikacija čistokrvnih životinja temeljila se na posebnim morfološkim kriterijima i / ili pedigreima.



Slika 35. a) Lokacije podrijetla LGD-ova. LGD-ovi su: ANAT – kangal, KRA – kraški ovčar, GPYR – pirinejski planinski pas, FONN – Fonnijev pas, MARM – maremansko abružanski pastirski pas, SILA – silski pastirski pas, TOR - tornjak, KUVZ - kuvas, SAR – šarplaninac, CAUC – kavkaski ovčar, TIBM – tibetski mastif. b) Naši uzorci balkanskih pastirskih pasa.

3.2 Molekularno-genetičke analize

3.2.1 Ekstrakcija DNA iz dlake

Komercijalno dostupan komplet reagensa DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany) korišten je za ekstrakciju DNA iz uzoraka pasa pasmina kraški ovčar, tornjak, šarplaninac i tibetski terijer. Ekstrakcija DNA provedena je tako da je 5 – 15 folikula odrezano približno 5 mm od korijena i stavljeno u 100 μ l pufera za liziranje [1 M Tris-HCl (pH 8,3), 2 M MgCl₂, 1 M KCl, 0,5 % Tween 20] s 1,5 μ l proteinaze K (20 mg/ml). Uzorci su inkubirani preko noći na 54 °C, zatim zagrijani 10 min na 94 °C.

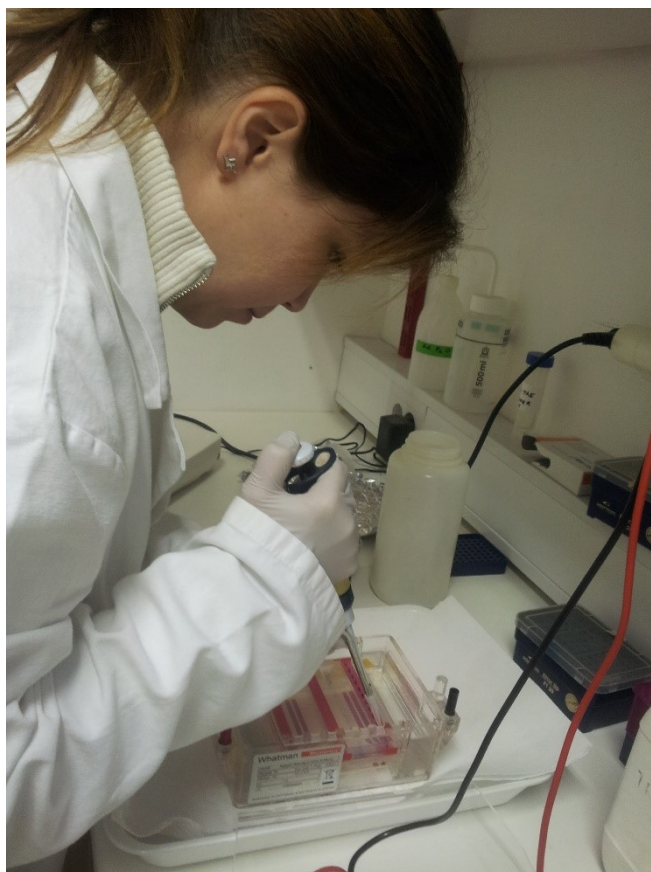
3.2.2 Provjera kvantitete i kvalitete ekstrahirane DNA

Kvantiteta i čistoća ekstrahirane DNA određena je uređajem NanoPhotometer P330 Spektrofotometer (IMPLEN, Njemačka) (Slika 36).



Slika 36. Uređaj NanoPhotometer P330 Spektrofotometer (IMPLEN, Njemačka) za mjerenje koncentracije DNA (Brajkovic et al. 2018).

Koncentracija DNA izmjerena je u volumenu 1 μ l u jedinicama μ l/ng. Čistoća DNA određena je omjerom apsorbancije pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀). Ako je omjer apsorbancija unutar raspona od 1,8 do 2, DNA je čista. Ukoliko je DNA kontaminirana ostacima proteina i fenola, omjer A₂₆₀/A₂₈₀ je < 1,8, dok omjer A₂₆₀/A₂₈₀ > 2 ukazuje na RNA kontaminaciju (Prilog: Tablica 4). Kvaliteta (integritet) ekstrahirane DNA provjerena je gel elektroforezom (Slika 37).



Slika 37. Uređaj za vodoravnu elektroforezu.

Volumen uzoraka od 5 μ l DNA analiziran je na 1-postotnom agaroznom gelu uz dodatak etidijevog bromida (13 μ l / 100 ml gel), 45 minuta na 120 V. Integritet DNA je vizualiziran koristeći UV transiluminator (Prilozi: Slika 56, 57, 58 i 59).

3.2.3 Umnažanje mitohondrijske DNA PCR-om

Kontrolna regija mtDNA od 680 parova baza umnožena je koristeći početnice F „upstream“ – H15422: (5'-CTCTTGCTCCACCATCAGC-3') i početnice R „downstream“ – L16106: (5'-AAACTATATGTCCTGAAACC-3') i PCR uvjete po radu Boyko i sur. (2009) koristeći Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) (Slika 38).

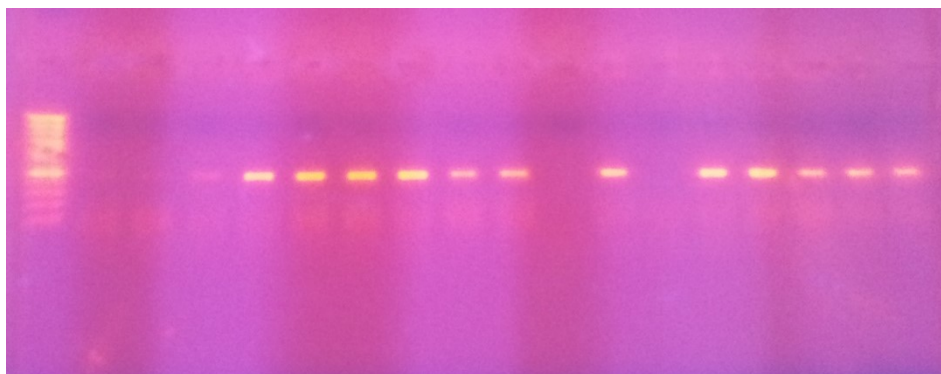


Slika 38. Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD).

Tablica 1. Korišteni reagensi i dijelovi PCR reakcije za umnožavanje kontrolne regije mtDNA

Reagensi: (Sigma Aldrich, Njemačka)	μl	Dijelovi PCR reakcije	Temperatura / °C	min ' / sec "	
Početnica F „upstream“	0,75	Početna denaturacija	95	5'	
Početnica R „downstream“	0,75	Denaturacija	94	40"	
H ₂ O destilirana sterilizirana	11,2	Vezivanje početnica	54	1'	35 ciklusa
Pufer B	1,5	Sinteza kompl. lanca	72	1'	
dNTP	0,75	Završno produživanje lanca	72	5'	
KAPA Taq HotStart DNA polimeraza	0,075				
DNA	1				
Ukupno	16,025				

Za provjeru uspješnosti PCR reakcije, 2 μl umnožene DNA provjereno je elektroforezom na 1-postotnom gelu u trajanju od 20 min na 80 V (Slika 39).



Slika 39. Slika PCR reakcije D-loop mtDNA na agaroznom gelu.

3.2.4 Umnažanje mikrosatelita PCR-om

Koristeći komplet reagensa (Canine Genotypes Panel 1.1, Thermo Scientific, California, SAD), pregledano je 18 mikrosatelitnih biljega [AHTK211 (CFA26), CXX279 (CFA22), REN169O18 (CFA29), INU055 (CFA10), REN54P11 (CFA18), INRA21 (CFA21), AHT137 (CFA11), REN169D01 (CFA14), AHTH260 (CFA16), AHTK253 (CFA23), INU005 (CFA33), INU030 CFA13), FH2848 (CFA2), AHT121 (CFA13), FH2054 (CFA12), REN162C04 (CFA7), AHTH171 (CFA6) i REN247M23 (CFA15)] predloženih po ISAG-u. Genotipizacija se izvodila na automatiziranom kapilarnom sekvenceru ABI3130xl. Mikrosatelitni aleli obrađeni su pomoću GENEMAPPER v 4.0 (ABI, Foster City, CA, SAD) i ručno provjereni.

Tablica 2. Korišteni reagensi i dijelovi PCR reakcije za umnožavanje ISAG seta mikrosatelita

Reagensi:					
(Thermo Scientific, SAD)	µl	Dijelovi PCR reakcije	Temperatura / °C	min ' / sec "	
Primer Mix	5	Početna denaturacija	98	3'	
Master Mix	5	Denaturacija	98	15"	
DNA	1	Vezivanje početnica	60	1'15"	35 ciklusa
		Sinteza kompl. lanca	72	30"	
Ukupno	11	Završno produživanje lanca	72	5'	

3.2.5 Pročišćavanje PCR produkata kontrolne regije mtDNA

Umnožena kontrolna regija mtDNA svakog uzorka prebačena je u epruvetu volumena 1,5 ml te su fragmenti pročišćeni prema protokolu Wizard®SV Gel i PCR Clean-Up System (Promega, SAD):

1. U epruvetu gdje su skupno prebačena umnožena tri fragmenta dodan je dvostruko veći volumen otopine „Membrane Binding Solution“ (MBS) u odnosu na volumen fragmenata.
2. SV Mini kolona prebačena je u epruvetu za skupljanje volumena 1,5 ml te je dodana jedna kap MBS-a u sredinu kolone.
3. Pripremljeni PCR produkt prebačen je u SV Mini kolonu i inkubiran na sobnoj temperaturi u trajanju od 4 min.
4. Sadržaj je centrifugiran na 16 000 x g 1 min. Centrifugirani sadržaj je uklonjen te je SV Mini kolona ponovno prebačena u epruvetu za skupljanje.
5. U SV Mini kolonu dodano je 700 µl otopine „Membrane Wash Solution“ (MWS) te je sadržaj centrifugiran na 16 000 x g 1 min. Centrifugirani sadržaj ponovno je uklonjen te je SV Mini kolona ponovno prebačena u epruvetu za skupljanje.
6. Korak 5 je ponovljen s 500 µl MWS. Sadržaj je centrifugiran na 16 000 x g 5 min.
7. Centrifugirani sadržaj ponovno je uklonjen te je SV Mini kolona ponovno prebačena u epruvetu za skupljanje i centrifugirana još jednom u trajanju od 1 min.
8. SV Mini kolona prebačena je u čistu epruvetu volumena 1,5 ml.
9. U SV Mini kolonu dodano je 30 µl „Nucelase-Free“ vode. Sadržaj je inkubiran na sobnoj temperaturi 3 min te centrifugiran na 16 000 x g 1 min.
10. SV mini kolona je uklonjena, a pročišćena DNA pohranjena na –20 °C.

3.2.6 Sekvenciranje mtDNA i mikrosatelita

Reakcije sekvenciranja kontrolne regije mtDNA provedene su na ABI 3130 DNA automatiziranom sekvenceru (Applied Biosystems, SAD) uz korištenje kompleta za sekvenciranje BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, SAD) i oba smjera.

Produktu umnoženih mikrosatelita dodali smo 10 µl HiDi Formamida (Applied Biosystems, SAD) i 0,35 µl boje GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific, SAD) te su epruvete vorteksirane i denaturirane 3 min na 95 °C. Reakcije sekvenciranja mikrosatelita provedene su na ABI 3130 DNA automatiziranom sekvenceru (Applied Biosystems, SAD).

3.2.7 Određivanje polimorfizama jednog nukleotida na genomu (SNP čip)

Genotipiziranje polimorfizama nukleotida na genomu (SNP čipova) izvedeno je u laboratoriju GeneSeek, Neogene Genomics, Velika Britanija pomoću Illumina CanineHD BeadChipa koji sadrži preko 170 000 biljega na psećem genomu CanFam 2.0. sekvenciranom na psu pasmine bokser (Tasha). Podaci dobiveni genotipiziranjem 72 naša uzorka spojeni su s javno dostupnim podacima iz repozitorija Dryad i GEO NCBI. Uzorci 24 tibetska terijera spojeni su s 5406 uzoraka pasa iz 163 pasmine preuzeta iz rada od Shannon i sur. (2015), dok su uzorci 12 kraških ovčara, 24 tornjaka i 12 šarplaninaca spojeni s 256 uzoraka pasa iz 23 pasmine i apeninskih vukova preuzetih iz rada od Talenti i sur. (2018) i 1346 pasa koji predstavljaju 161 pasminu preuzetih iz rada od Parker i sur. (2017).

3.2.8 Analiza mikrosatelita

Da bismo usporedili podatke genotipizirane pomoću CanineHD BeadChipa s mikrosatelitima, ispitali smo 18 mikrosatelitskih lokusa koje je predložilo Međunarodno društvo za genetiku životinja (ISAG): AHTK211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT121, FH2054, REN162C04, AHT132, AHT132, RHT162, AHT132, RTH162, AHT132, RTH162, AHT132, RTH162, AHT132, RTH162, AHT132, RHT162 INU005, AHTH171 i REN247M23, koristeći komplet za reagense (Canine Genotyping Panel 1.1, Thermo Scientific, California, SAD). Genotipizacija je izvedena na kapilarnom Genetic Analyzeru ABI 3130xl. Prozvani su mikrosatelitski aleli pomoću GENEMAPPER v 4.0 (ABI, Foster City, CA, SAD) i ručno provjereni.

Analiza glavnih komponenti (Principal Component Analysis – PCA) provedena je koristeći mikrosatelitne genotipove kako bi se odredili odnosi između različitih linija i pasmina pasa. PCA analiza izvedena je pomoću pca3d (Weiner i sur., 2012) i plyr (Hadley, 2011) paketa za RStudio.

3.2.9 Analiza nukleotidnih sljedova

U svrhu vizualizacije i provjere poravnanja nukleotidnih sljedova CR mtDNA korišten je program MEGA7 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets (Kumar i sur., 2016). Isti program korišten je i za određivanje varijabilnih mjesta, parsimonijskih informativnih mjesta (engl. parsimony informative sites) i singleton mjesta. Parsimonijska informativna mjesta vrsta su varijabilnih mjesta u setu nukleotidnih sljedova koja se pojavljuju u najmanje dva nukleotidna slijeda, dok su singleton mjesta varijabilna mjesta specifična samo za jedan nukleotidni slijed.

Referentni slijed kompletne mtDNA psa korišten u ovoj disertaciji pohranjen je u repozitoriju GeneBank pod brojem NC_002008 (Kim i sur., 1998).

3.2.10 Analiza varijabilnosti mitohondrijske DNA

Kako bi se utvrdila varijabilnost nukleotidnih sljedova mitohondrijske DNA pasmina kraški ovčar, šarplaninac, tornjak i tibetski terijer, korišteni su sljedeći programi:

1. Set za rad o kraškom ovčaru, šarplanincu i tornjaku sastojao se od 223, dok se set za rad o tibetskom terijeru sastojao od 175 nukleotidnih sljedova CR mtDNA, i oba seta sljedova poravnata su uz referentni mitogenom psa (Kim i sur., 1998).
2. U svrhu vizualizacije i provjere poravnanja nukleotidnih sljedova CR mtDNA korišten je program MEGA7 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets (Kumar i sur., 2016). Isti program korišten je i za određivanje varijabilnih mjesta, parsimonijskih informativnih mjesta (engl. parsimony informative sites) i singleton mjesta. Parsimonijska informativna mjesta vrsta su varijabilnih mjesta u setu nukleotidnih sljedova koja se pojavljuju u najmanje dva nukleotidna slijeda, dok su singleton mjesta varijabilna mjesta specifična samo za jedan nukleotidni slijed.

3.2.11 Konstrukcija i vrste haplotipova / haplogrupa

Haplotipovi CR mtDNA pasa konstruirani su na temelju svih varijabilnih mjesta CR mtDNA koristeći program DNAsp v5 (Librado i Rozas, 2009) i MEGA7 (Kumar i sur., 2016).

3.2.12 Filogenetska analiza

CR mtDNA klasificirana je u određene haplotipove / haplogrupe pomoću programa MitoToolPy (Peng i sur., 2015) koji kao referentu bazu koristi 424 mitogenoma pasa (*Canis familiaris*) i sivog vuka (*Canis lupus*). Referentna baza obuhvaća dostupne nukleotidne sljedove mitogenoma pohranjene u banci gena – NCBI (engl. GenBank) (Clark i sur., 2016) do 26. listopada 2014. godine.

Program PopArt (Leigh i Bryant, 2015) korišten je za izradu *median-joining* (MJ) mreže (Bandelt i sur., 1999) kako bi se vizualizirao filogenetski odnos haplotipova / haplogrupa analiziranih CR mtDNA pasa.

3.2.13 Genotipiziranje pomoću SNP-ova – CanineHD BeadChip

Svi uzorci genotipizirani su na poluprilagođenom Illumina SNP nizu koji sadrži 173 662 SNP-ova iz niza CanineHD BeadChip.

Za analizu kraških ovčara, tornjaka i šarplaninaca kontrola kvalitete i spajanje podataka SNP čipa izvedeni su korištenjem paketa SNP & Variation Suite v8.7.0 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com). Prvo smo filtrirali podatke dobivene genotipizacijom 12 kraških ovčara, 24 tornjaka i 12 šarplaninaca, a zatim 256 uzoraka pasa iz 23 pasmine i apeninskih vukova preuzetih iz rada Talenti i sur. (2018) te 1346 pasa koji predstavljaju 161 pasminu preuzetih iz rada od Parker i sur. (2017). Za daljnju analizu uključeno je 211 uzoraka pasa iz 17 pasmina i sivi vuk s razinom poziva višom od 90 %. Nakon spajanja naših podataka s javno dostupnim podacima ostalo je 107 403 SNP-ova raspoređenih po svim autosomalnim kromosomima.

Za analizu tibetskih terijera kontrola kvalitete i spajanje podataka SNP čipa izvedeni su korištenjem paketa SNP & Variation Suite v8.7.0 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com). Prvo smo filtrirali podatke dobivene genotipizacijom 24 tibetska terijera. Ukupno 168 102 biljega ostalo je nakon isključenja biljega na X kromosomu, a 156 708 biljega ostalo je nakon filtriranja sa stopom poziva (call rate) manjom od 95 % i HWE P-vrijednosti manjom od 0,00001. Za daljnju analizu uključeno je 18 uzoraka sa stopom poziva višom od 90 %. Nakon spajanja naših podataka s javno dostupnim podacima ostalo je 143 170 SNP-ova raspoređenih po svim autosomalnim kromosomima. Prosječna gustoća biljega bila je jedan SNP na svakih 15 404 kb. Iz javno dostupnih podataka izuzeli smo seoske pse i pse mješance te napokon odabrali 19 predstavnika s najvišom stopom poziva od svake pasmine. Međutim, za neke pasmine dostupno je manje od 19 uzoraka. Tibetski terijeri podijeljeni su u pet potpopulacija (izvorni, Lamleh, Luneville, F1 i tibetski terijeri iz baze Dryad (Shannon i sur., 2015)).

Kako bismo precizno procijenili genetske strukture naših uzoraka podijeljenih u dva seta podataka, koristili smo razne metode. U setu kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka, tornjake smo dijelili na bosanskohercegovačke i hrvatske tornjake. U drugom setu podataka tibetski terijeri podijeljeni su u dvije populacije: tibetske terijere zapadnog svijeta i izvornu tibetsku populaciju te dodatno u sedam potpopulacija: izvornu, zapadnu – Lamleh, zapadnu – Luneville liniju i F1 filijalnu generaciju križanaca između pasa izvorne populacije i pasa Lamleh linije, BC2 generaciju povratnog križanja F1 generacije s Lamleh linijom i BC3 generaciju povratnog križanja BC2 generacije s Lamleh linijom i tibetske terijere iz baze podataka (Shannon i sur., 2015).

Prvo smo izračunali pairwise Nei genetske udaljenosti između jedinki koristeći ape R paket (Paradis i Schliep, 2019). Neighbor-joining stablo za skup podataka s tibetskim terijerom izračunato je na temelju matrice udaljenosti pomoću phyclust R paketa (Chen, 2011), dok je za skup s kraškim ovčarom, šarplanincem i tornjakom provedena

diskriminacijska analiza glavnih komponenata (DAPC) pomoću R paketa ADGENET (Jombard i sur., 2010), a kako bi se odredio optimalan broj klastera, napravljeno je uzastopno klasteriranje k-sredine i Bayesov informacijski kriterij (BIC).

Filogenetski odnosi analizirani su korištenjem mreže NeighborNet temeljene na Nei udaljenosti pomoću softvera SplitsTree4 (Huson i Bryant, 2005). Tibetske terijere podijelili smo u dvije populacije: izvornu populaciju (TTNA) i zapadnu populaciju tibetskih terijera (TT).

Uzorci rascjepa i mješavina otkriveni su korištenjem softvera Treemix (Pickrell i Pritchard, 2012) i postavljanjem sivog vuka (Grey_Wolf) kao vanjske grupe za ukorjenjivanje. Tornjake smo ostavili kao jedinstvenu populaciju, dok smo tibetske terijere podijelili u pet potpopulacija (izvorni tibetski terijer, Lamleh linija tibetskog terijera, Luneville linija tibetskog terijera, tibetski terijer F1 generacije križanja izvornih s Lamleh linijom tibetskih terijera i tibetski terijeri iz baze Dryad (Shannon i sur., 2015)). Prvo smo izgradili stablo maksimalne vjerojatnosti populacija bez migracija. Zatim smo izgradili filogenetsku mrežu za sve odabrane populacije, povećavajući na taj način događaje migracije do 11 migracija. Zaostaci od odgovarajućih modela prema podacima vizualizirani su pomoću R skripte implementirane u Treemixu.

Za ispitivanje strukture populacije iz podataka SNP čipa i mikrosatelitskog genotipiziranja korištena je metoda grupiranja utemeljena na modelu STRUCTURE (Pritchard i sur., 2000). Broj pretpostavljenih klastera (označen s K) i vizualizacija rezultata izvedeni su korištenjem web-alata CLUMPAK (Kopelman i sur., 2015).

Podaci SNP čipa korišteni su za ispitivanje strukture populacije dva seta podataka. Za set od kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka napravljena su dva skupa: 1) 211 pasa iz 18 pasmina i sivi vuk, 2) skup SNP nizova podataka uključujući samo tornjake. Za set tibetskog terijera napravljene su setovi: 1) 366 pasa iz 29 pasmina i sivi vuk, 2) skup SNP nizova podataka, uključujući samo uzorke tibetskog terijera.

Prvi set podataka CanineHD BeadChip od 168 102 SNP-ova prorijeđen je metodom pruninga veličine prozora 50, veličine koraka 5 i svih parova (r^2 , engl. pairwise) koji imaju LD od 0,1 te smo dobili podatke za 22 226 SNP-ova.

Kako bismo računski i drugi set CanineHD BeadChip od 143 170 SNP-ova sveli na idealnih 22 000 SNP-ova, prorijeđen je istom metodom, ali ovog puta veličine prozora 100, veličine koraka 20 i svih parova (r^2 , engl. pairwise) koji imaju LD od 0,1 te smo dobili podatke za 22 175 SNP-ova.

Korišten je model s pretpostavkom primjene i koreliranim frekvencijama alela za sva izvršenja STRUCTURE programa, sa sagorijevanjem (engl. burn-in) od 10^6 iteracija, nakon čega slijedi 10^5 MCMC iteracija. Izvršenja su se ponavljala 10 puta za svaku vrijednost K, koja se, ovisno o setu, kretala od 1 do 25 za veći skup podataka (18 pasmina i vuk), od 1 do 5 za skup samo tornjaka, od 1 do 35 za veći skup podataka (29 pasmina pasa i sivi vuk) i od 1 do 5 za podskup uzoraka tibetskog terijera.

Program STRUCTURE korišten je i za procjenu broja genetskih populacija kod tornjaka i tibetskog terijera na temelju alelnih frekvencija mikrosatelita sa sagorijevanjem (engl. burn-in) od 10^6 iteracija, nakon čega je uslijedilo 10^5 MCMC iteracija. Izvršenja su se ponavljala 10 puta za svaku K vrijednost, $K = 1 - 5$ za tornjake i $K = 1 - 6$ za tibetske terijere. Svi uzorci tornjaka i tibetskog terijera uključeni u analizu SNP čipa bili su prisutni u skupu podataka mikrosatelita. Međutim, mikrosatelitski skup podataka sastojao se od dodatnih uzoraka koji nisu genotipizirani SNP čipom.

Nizovi homozigotnosti (ROH) identificirani su za svakog pojedinca zasebno koristeći SNP & Variation Suite v8.8.3 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com). ROH-ovi su definirani kao 25 ili više homozigotnih SNP-ova. Minimalna duljina izvođenja postavljena je na 500 kb, nije bilo dozvoljenih heterozigotnih SNP-ova i nije bilo više od pet SNP-a koji nedostaju unutar ROH-a. ROH-ovi za kraške ovčare, šarplanince i tornjake podijeljeni su u četiri kategorije duljine: $FROH < 2$ Mb, $FROH 2 - 5$ Mb, $FROH 5 - 10$ Mb i $FROH > 10$ Mb. Slično kao u ostalim studijama (Sams i Boyko, 2019), ROH-ovi tibetskih terijera sažeti su u tri kategorije duljine: 0,5 Mb – 2,5 Mb kratki; 2,5 Mb – 5,0 Mb srednji; > 5Mb dugi. Genomski koeficijenti inbreedinga (FROH) izračunati su kao što je već objavljeno (McQuillan et al. 2008) i definirani su kao proporcija autozigotnosti autosoma koji se nalaze u ROH-u. Duljina autosomnog genoma postavljena je na 2 392 715 236 bp.

4 REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1 Kvantiteta i čistoća ekstrahirane DNA

Deskriptivna statistika izmjerene koncentracije i čistoće ekstrahirane DNA pet pasmina pasa i sivog vuka prikazana je u Tablici 3. Veća srednja vrijednost koncentracije DNA uočena je kod uzoraka šarplaninaca (93,94 ng/μl), a najveći raspon od 1 do 311 ng/μl kod kraškog ovčara. Prosjek omjera A260/A280 veći od 2 kod tornjaka, tibetskog terijera i vuka ukazuje na RNA kontaminaciju kod DNA ekstrahirane iz dlake. Bez obzira na odstupanje koncentracije i čistoće DNA od preporučene, pripremljene su biblioteke 87 uzoraka kraškog ovčara, 81 uzorka šarplaninca, 100 uzoraka tornjaka, 62 uzorka tibetskog terijera i četiri uzorka vuka te im je uspješno određen nukleotidni slijed.

Tablica 3. Statistika koncentracije i čistoće DNA pasa i vuka

Materijal	Koncentracija DNA *ng/μl				Čistoća DNA 260/280 (nm)		
	N*	Prosjek	Raspon	SE**	Prosjek	Raspon	SE**
Kraški ovčar	87	41,58	1–311	53,73	1,74	–2 – 4	0,65
Šarplaninac	81	93,94	5–284	54,04	1,10	0,80 – 1,71	0,19
Tornjak	100	28,87	2–254	53,02	2,29	0,79 – 6	1,09
Tibetski terijer	62	7,36	0–20,5	4,91	2,36	–3 – 6	1,31
Vuk	4	8,5	6,5–11	2,12	2,20	2,11 – 2,33	0,09

* N – broj jedinki; **SE – standardna greška.

4.2 Filogenetska stabla i mreže

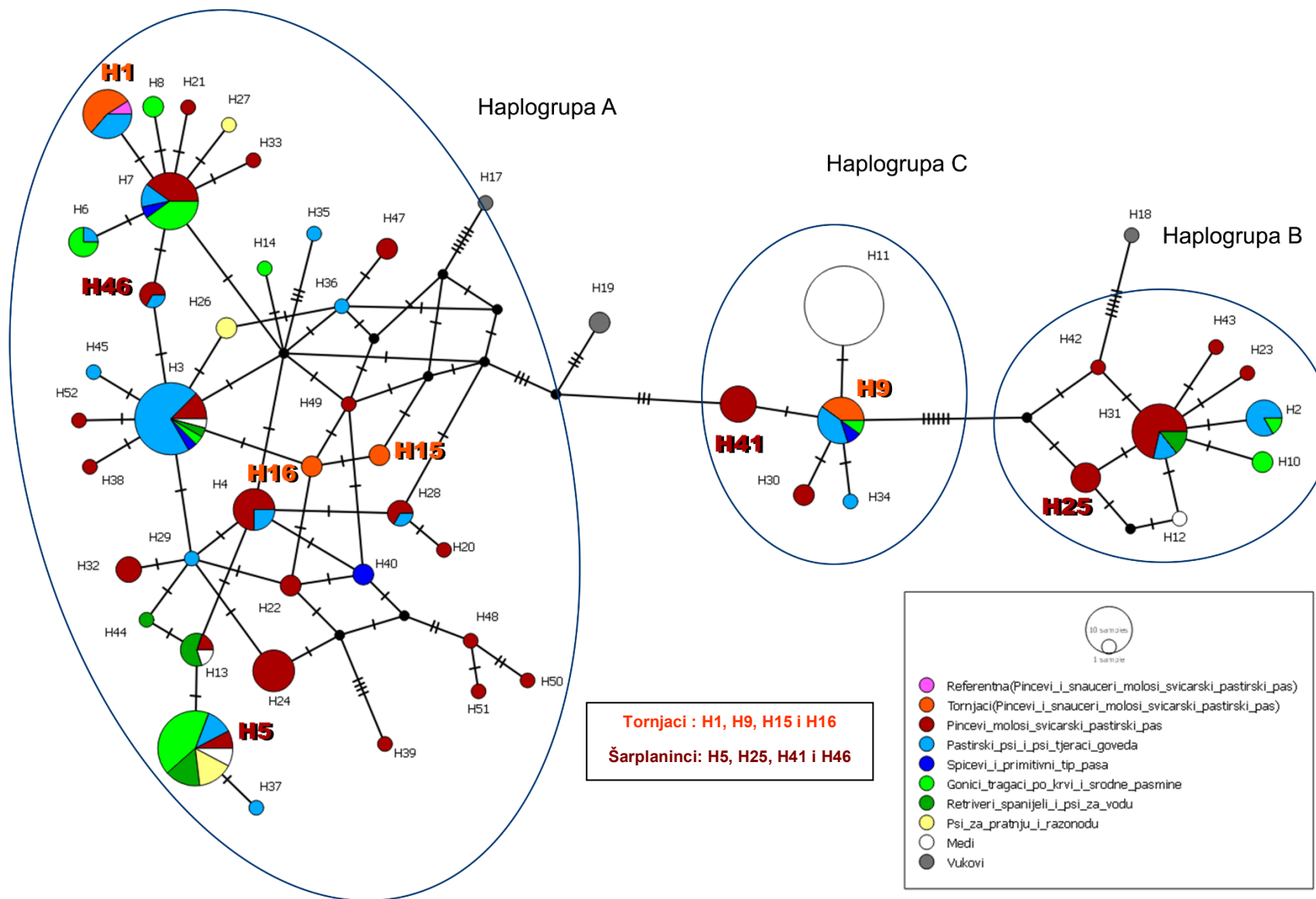
4.2.1 Genetska varijabilnost kontrolne regije mitohondrijske DNA kraškog ovčara, tornjaka i šarplaninca

U analizi 223 CR-a mtDNA duge 520 bp identificirali smo 49 haplotipa pasa i 3 haplotipa vukova. Na slici 40 prikazana je filogenetska pozicija tih haplotipova *median-joining* mrežom koja se dijeli na tri haplogrupe: A, B i C. Referentna sekvenca pseće mtDNA smještena je u haplotip H1 u haplogrupi A. Haplogrupa A je najveća i u njoj se nalazi 36 haplotipova (H1, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H13, H14, H15, H16, H20, H21, H22, H24, H26, H27, H28, H29, H32, H33, H35, H36, H37, H38, H39, H40, H44, H45, H46, H47, H48, H49, H50, H51 i H52). Haplogrupa B je srednje veličine i sadrži osam haplotipova (H2, H10, H12, H23, H25, H31, H42 i H43), dok je haplogrupa C najmanja i sadrži pet haplotipova (H9, H11, H30, H34 i H41). Tornjaci se nalaze u haplogrupi A (haplotipovi H1, H15 i H16) i haplogrupi C (haplotip H9), dok se šarplaninci nalaze u svim haplogrupama [A (haplotip H5 i H46), B (haplotip H25) i C (haplotip H41)].

Haplogrupa A je najveća i obuhvaća sve FCI grupe pasa navedene u ovoj analizi (Pinčevi i šnaučeri, molosi i švicarski pastirski psi; Pastirski psi i psi tjerači goveda; Špicevi i primitivni tip pasa; Goniči, tragači po krvi i srodne pasmine; Retriveri, španijeli i psi za vodu; Psi za pratnju i rasonodu). U haplogrupi B i C zastupljene su po četiri FCI grupe, i to u haplogrupi B: Pinčevi i šnaučeri, molosi i švicarski pastirski pas, Pastirski psi i psi tjerači goveda, Goniči, tragači po krvi i srodne pasmine, Retriveri, španijeli i psi za vodu, dok su u haplogrupi C zastupljene grupe: Pinčevi i šnaučeri, molosi i švicarski pastirski pas, Pastirski psi i psi tjerači goveda, Špicevi i primitivni tip psa, Goniči, tragači po krvi i srodne pasmine. Još nepriznata FCI pasmina, hrvatska nacionalna pasmina - međimurski mali pas, nalazi se u sve tri haplogrupe. To je u skladu s rezultatima iz prijašnjih radova o mtDNA pasa. Općenito, psi često nisu grupirani u pripadajuću pasminu prema svojim haplogrupama mtDNA zbog dijeljenja haplotipa (Gundry i sur., 2007; Parra i sur., 2008; Kropatsch i sur., 2011; Desmyter i Gijsbers, 2012; Suárez et al. 2013). Učestalosti haplotipova mogu se razlikovati između određenih pasmina i cijelog genskog bazena pseće mtDNA, kao i među pasminama (Gundry i sur., 2007; Parra i sur., 2008; Webb i Allard, 2009; Kropatsch i sur., 2011; Desmyter i Gijsbers, 2012; Suárez i sur., 2013).

Haplotip najveće frekvencije jest haplotip H11 u haplogrupi C koji sadrži 29 jedinki koje pripadaju samo pasmini međimurski mali pas. Tornjaci su prisutni u haplotipovima H1, H9, H15 i H16, pri čemu su haplotipovi H15 i H16 jedinstveni i tvore ih samo po dva tornjaka, dok ostale haplotipove tornjaci dijele s još nekim pasminama. U haplotipu H1 osim tornjaka (6/11) nalazi se još referentna sekvenca (1/11) i njemački ovčari (4/11), dok haplotip H9

tornjaci (4/10) dijele s istarskim kratkodlakim goničem (1/10), njemačkim ovčarem (4/10) i sibirskim haskijem (1/10). Zanimljivo je da su se hrvatski tornjaci grupirali zajedno u haplotipu H1 i H16 u haplogrupi A, dok su se bosanskohercegovački tornjaci grupirali u haplotip H15 u haplogrupi A i u haplotip H9 u haplogrupi C. Šarplaninci se nalaze u haplotipovima H5, H25, H41 i H46. Haplotip H5 šarplaninci (2/26) dijele s dalmatinskim psima (11/26), međimurskim malim psom (2/26), kavalir španijelom kralja Charlesa (4/26), njemačkim ovčarem (3/26) i labrador retrieverom (4/26). Šarplaninci (2/4) dijele haplotip H25 s kavkaskim ovčarem (1/4) i anatolskim ovčarem (1/4), a haplotip H41 šarplaninci (4/6) dijele samo s anatolskim ovčarem (2/6). Haplotip H46 šarplaninci (2/3) dijele s maremano abruceškim pastirskim psom (1/3). Četiri vuka grupirala su se u tri haplogrupe, i to N (haplotip H17), J (haplotip H18) i D (haplotip H19). Haplotip vukova H17 iz haplogrupe N najbliži je haplogrupi A i udaljen je osam mutacija od najbližih bosanskohercegovačkih tornjaka u haplotipu H15, a devet mutacija od hrvatskih tornjaka u haplotipu H16. Od udaljenijih tornjaka u haplotipu H1 vukovi haplotipa H17 udaljeni su 11 mutacija. Od najbližih šarplaninaca u haplotipu H46 haplotip H17 udaljen je također 11 mutacija, a 13 mutacija od šarplaninaca u haplotipu H5. Vukovi haplotipa H19 iz haplogrupe D udaljeni su osam mutacija od bosanskohercegovačkih tornjaka u haplotipu H15 i devet mutacija od hrvatskih tornjaka u haplotipu H16. Od tornjaka u haplotipu H1 udaljeni su 11 mutacija. Šarplaninci haplotipa H46 također su udaljeni 11 mutacija od vukova haplotipa H19, dok su šarplaninci haplotipa H5 udaljeni 10 mutacija. Haplotip vukova H18 iz haplogrupe J najbliži je haplogrupi B te su oni udaljeni osam mutacija od šarplaninaca haplogrupe H25 (detaljnije u priložima: Tablica 5).



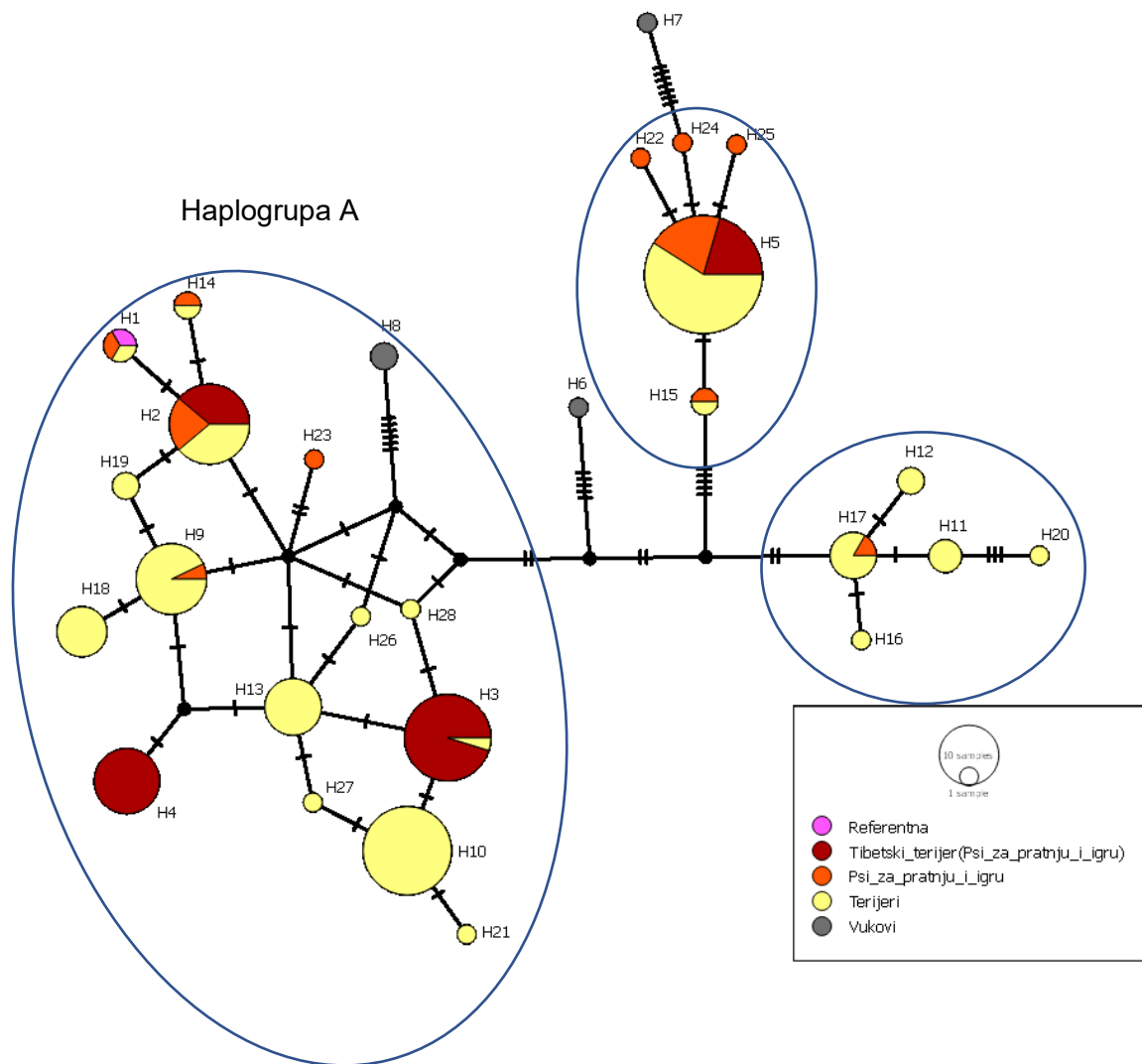
Slika 40. *Median-joining* mreža filogenetskog odnosa haplotipova pronađenih u tornjaka i šarplaninca u odnosu na haplotipove pronađene u drugim pasminama pasa i četiri uzorka vuka. *Median-joining* mreža konstruirana je na temelju 52 haplotipa koji su dobiveni usporedbom 224 uzorka CR-a mtDNA duljine 520 bp. Krugovi su proporcionalni frekvenciji haplotipova. Ljubičasta boja označava referentni haplotip za vrstu *Canis familiaris* (Kim i sur., 1998), narančasta označava tornjake, tamnocrvena ostale pasmine pasa iz FCI grupe Pinčevi i šnaučeri te molosi i švicarski pastirski psi, svijetloplava pasmine pasa iz FCI grupe Pastirski psi i psi tjerači goveda, tamnoplava pasmine pasa iz FCI grupe Špicevi i primitivni tip pasa, svijetlozelena pasmine pasa iz FCI grupe Goniči, tragači po krvi i srodne pasmine, tamnozeleno pasmine pasa iz FCI grupe Retriveri, španijeli i psi za vodu, žuta pasmine pasa iz FCI grupe Psi za pratnju i rasonodu, bijela pse pasmine međimurski mali pas i siva vukove. Okomite crte označavaju broj mutacija između haplotipova. Detaljnije informacije o pripadnosti pojedine jedinice određenom haplotipu mogu se pronaći u prilogu.

4.2.2 Genetska varijabilnost kontrolne regije mitohondrijske DNA tibetskog terijera

U analizi 176 CR-a mtDNA duge 567 bp identificirali smo 25 haplotipa pasa i tri haplotipa vukova (Slika 41). Filogenetska pozicija tih haplotipova prikazana je *median-joining* mrežom koja se dijeli na tri glavne haplogrupe: A, B i C. U haplotipu H1, haplogrupe A nalazi se referentna sekvenca pseće mtDNA. Najveća je haplogrupa A i u njoj se nalazi 15 haplotipova (H1, H2, H3, H4, H9, H10, H14, H13, H18, H19, H21, H23, H26, H28 i H27). Haplogrupa B sadrži 5 haplotipova (H5, H15, H22, H24 i H25) kao i haplogrupa C (H11, H12, H16, H17 i H20). Tibetski terijeri nalaze se u haplogrupi A (haplotipovi H2, H3 i H4) i haplogrupi B (haplotip H5).

Tri haplogrupe (A, B i C) jasno su odijeljene i tibetski terijeri pripadaju haplogrupama A i B, dok se druge pasmine terijera kao i pasa iz FCI grupe patuljastih pasa i pasa pratitelja nalaze u sve tri haplogrupe. Rezultat gdje su psi istih pasmina rasprostranjeni u više haplogrupa sukladan je rezultatima drugih autora koji su proučavali mtDNA pasa (Gundry i sur., 2007; Parra i sur., 2008; Kropatsch i sur., 2011; Desmyter i Gijbers, 2012; Suárez i sur., 2013; Webb i Allard, 2009; Desmyter i Gijbers, 2012; Suárez i sur., 2013).

Haplotip najveće frekvencije jest haplotip H5 u haplogrupi B koji sadrži 39 jedinki (1/39 tibetskih terijera Lamleh linije, 7/39 izvornih tibetskih terijera, 1/39 tibetskih terijera svjetske baze zapadnih linija terijera, 22/39 pasa iz grupe terijera, 8/39 pasa iz grupe patuljastih i pasa pratitelja). Tibetski terijeri još su prisutni u haplotipovima H2, H3 i H4, pri čemu je haplotip H4 jedinstven za tibetske terijere i tvore ga 12 tibetskih terijera od kojih ih je devet iz Lamleh linije, jedan je F1 križanac, jedan F2 križanac, a jedan F3 križanac. U haplotipu H2 osim tibetskih terijera (5/18 izvornih tibetskih terijera i 2/18 tibetskih terijera F1 križanaca) nalazi se još (7/18) terijera i (4/18) pasa iz grupe patuljastih i pasa pratitelja. U haplotipu H3 osim tibetskih terijera (8/21 Lamleh linije, 2/21 Luneville linije, 3/21 F1 križanaca, 5/21 F2 križanaca i 2/21 F3 križanaca) nalazi se samo još jedan terijer. Četiri vuka grupirala su se u tri haplogrupe, i to N (haplotip H6), J (haplotip H7) i D (haplotip H8). Haplotip vukova H8 iz haplogrupe D najbliži je haplogrupi A i udaljen je sedam mutacija od najbližih tibetskih terijera u haplotipu H2, od tibetskih terijera u haplogrupi H3 dijeli ga devet mutacija, a od tibetskih terijera u haplogrupi H4 10 mutacija. Vukovi haplotipa H6 iz haplogrupe N udaljeni su od tibetskih terijera iz haplogrupe H3 devet mutacija, iz haplogrupe H2 10 mutacija, a od tibetskih terijera iz haplogrupe H4 12 mutacija. Vukovi haplotipa H7 iz haplogrupe J najbliži su haplogrupi B i od najbližih tibetskih terijera iz haplotipa H5 dijeli ih sedam mutacija. Detaljnije u priložima (Tablica 6).



Slika 41. *Median-joining* mreža filogenetskog odnosa haplotipova pronađenih u tibetskih terijera u odnosu na haplotipove pronađene u drugim pasmina pasa iz grupe terijera i patuljastih pasmina pasa i pasa pratitelja te četiri uzorka vuka. *Median-joining* mreža konstruirana je na temelju 28 haplotipova koji su dobiveni usporedbom 176 uzoraka CR-a mtDNA duljine 567 bp. Krugovi su proporcionalni frekvenciji haplotipova. Ljubičasta boja označava referentni haplotip za vrstu *Canis familiaris* (Kim i sur., 1998), tamnocrvena boja označava tibetske terijere, narančasta označava pasmine pasa iz FCI grupe Patuljasti psi i psi pratitelji, žuta pasmine pasa iz FCI grupe Terijeri i sive vukove. Okomite crte označavaju broj mutacija između haplotipova. Detaljnije informacije o pripadnosti pojedine jedinke određenom haplotipu mogu se pronaći u prilogu.

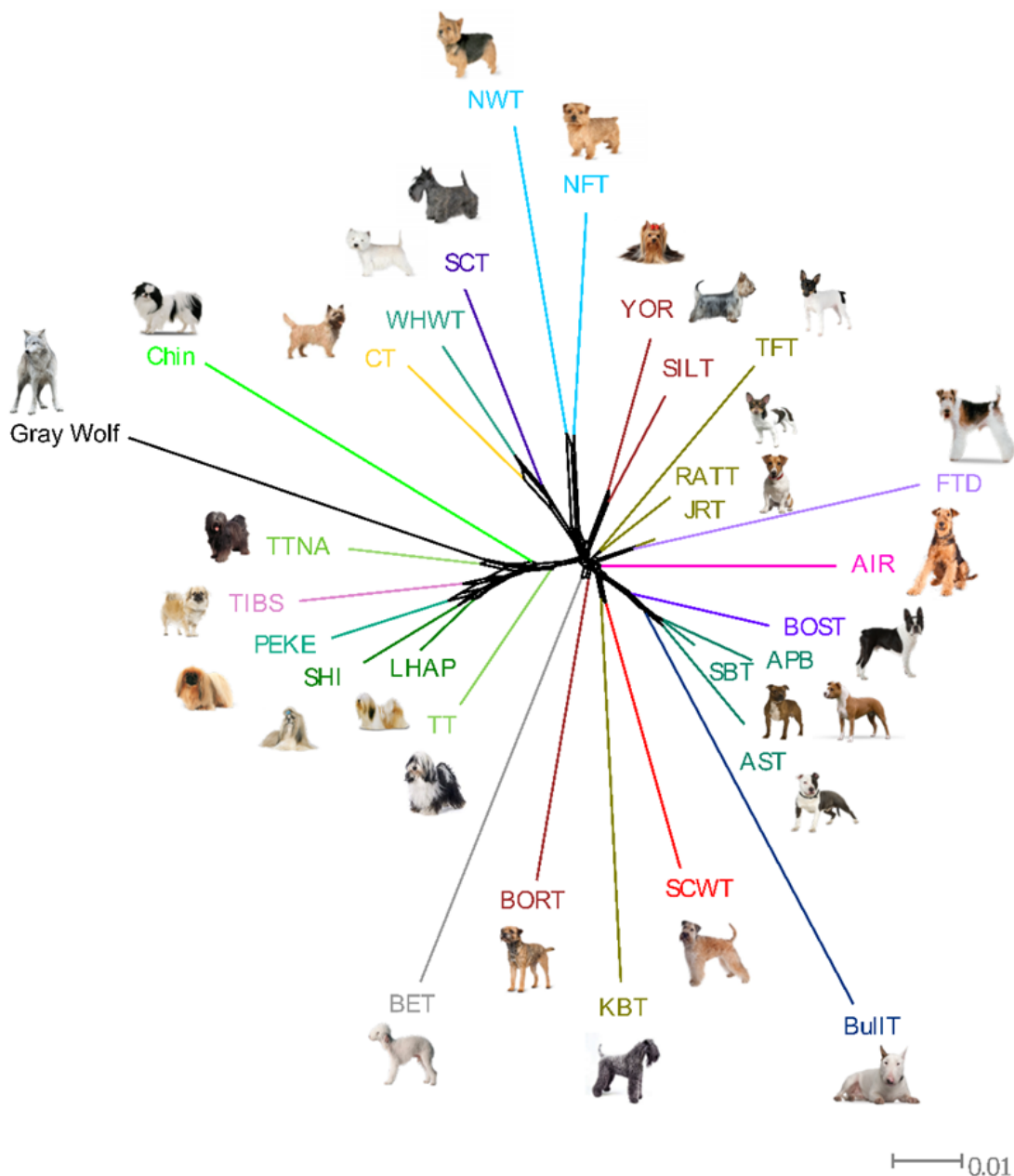
unutarnjim granama koje razlikuju pasmine otkrivena je relativno mala struktura. To je u skladu s pretpostavkom da su sve moderne pasmine pasa nastale iz zajedničke populacije predaka tijekom relativno kratkog vremenskog razdoblja te da samo mali dio genetske varijacije dijeli pasmine pasa na podskupine. Tibetski terijeri formirali su dva klastera: jedan koji uključuje izvornu tibetsku populaciju i njenu F1 generaciju križanu sa zapadnom populacijom, grupiran zajedno s drevnim pasminama kao što su afganistanski hrt, samojed, sloughi i sibirski haski, dok su zapadne linije bile dio klastera tibetskih pasa pratitelja, uključujući pasmine tibetski španijel, pekinezer, shih tzu i lhasa apso, i one su pokazale povezanost s klasterom terijera. To bi moglo sugerirati barem sporadične kontakte zapadnih linija s nekim pasminama terijera tijekom prošlog stoljeća. Unutarnje grane koje dovode do populacije boksera i sivog vuka dulje su od onih koje vode do drugih pasmina. Duga grana boksera mogla bi se objasniti činjenicom da je velik udio SNP-ova na psećem HD nizu odabran usporedbom boksera s drugim pasminama, što implicira da je skup podataka obogaćen za SNP-ove koji omogućuju razlikovanje boksera od ostalih pasmina. Dulja grana sivog vuka vjerojatno odražava udaljeniju povezanost (Slika 42).

Neke pasmine pokazuju jasnu tendenciju ka stvaranju pasminskih klastera, poput retrievera, španijela, setera i terijera. Međutim, duljina unutarnjih grana koje vode do tih klastera samo je mali dio prosječne ukupne duljine grana u tim klasterima, što ukazuje da su znatna uska grla bila povezana s formiranjem različitih pasmina, iako detaljna analiza tih podataka općenito podupire zajedničko povijesno podrijetlo srodnih pasmina. Stablo je u skladu s prethodnim studijama i podupire točnost i pouzdanost genotipova dobivenih analizom psećeg HD SNP čipa. Iako duga grana boksera najvjerojatnije odražava SNP pristranost niza, stablo i dalje odražava opsežne polimorfizme, unutar i između pasmina. To podupire očekivanje da utvrđivanje pristranosti SNP-a ne sprječava otkrivanje genetske varijacije unutar i između pasmina.

Na NeighborNet grafu (Slika 43) vuku su najbliži tibetski mastif (TIBM) i sibirski haski (HUSK). S gornje strane, nakon TIBM slijede ostali LGD-ovi počevši s CAUC, a završavajući s FONN. U sredini, između CAUC i KUVZ su se našli naši uzorci SAR i TOR. Od ostalih LGD-ova, naši uzorci KRA se smještaju s donje strane grafa nakon GSD. Retikulacije između KRA i GSD ukazuju na sporadična križanja među tim pasminama, a ANAT se smješta na sredini grafa s donje strane između popularnih pasmina PEKE i COLL i nema jasnih vidljivih retikulacija. Klaster od LAB do COLL s donje strane sadržava radne pasmine pasa s iznimkom CKCS, koji su s početka uzgoja trebali postati radna pasmina, no okolnosti su ih pretvorile u isključivo kućne ljubimce i pse za pratnju.

4.2.4.2 NeighborNet mreža tibetskog terijera

Pasmine koje pripadaju istoj FCI pasminskoj grupi (terijeri) grupirane su (Slika 44). Sve populacije tibetskog terijera također su grupirane i populacija TTNA se razgranala bliže sivom vuku nego bilo koja druga pasmina. TIBS, PEKE, SHI i LHAP granali su se između TTNA i TT, dok je Chin bio na vlastitoj grani. Skupovi paralelnih rubova na NeighborNet mreži promatrani između TTNA i drugih tibetskih patuljastih pasmina (TIBS, PEKE, SHI i LHAP) ukazuju na događaje hibridizacije između njih. Ostale pasmine terijera činile su zasebnu skupinu s druge strane mreže.

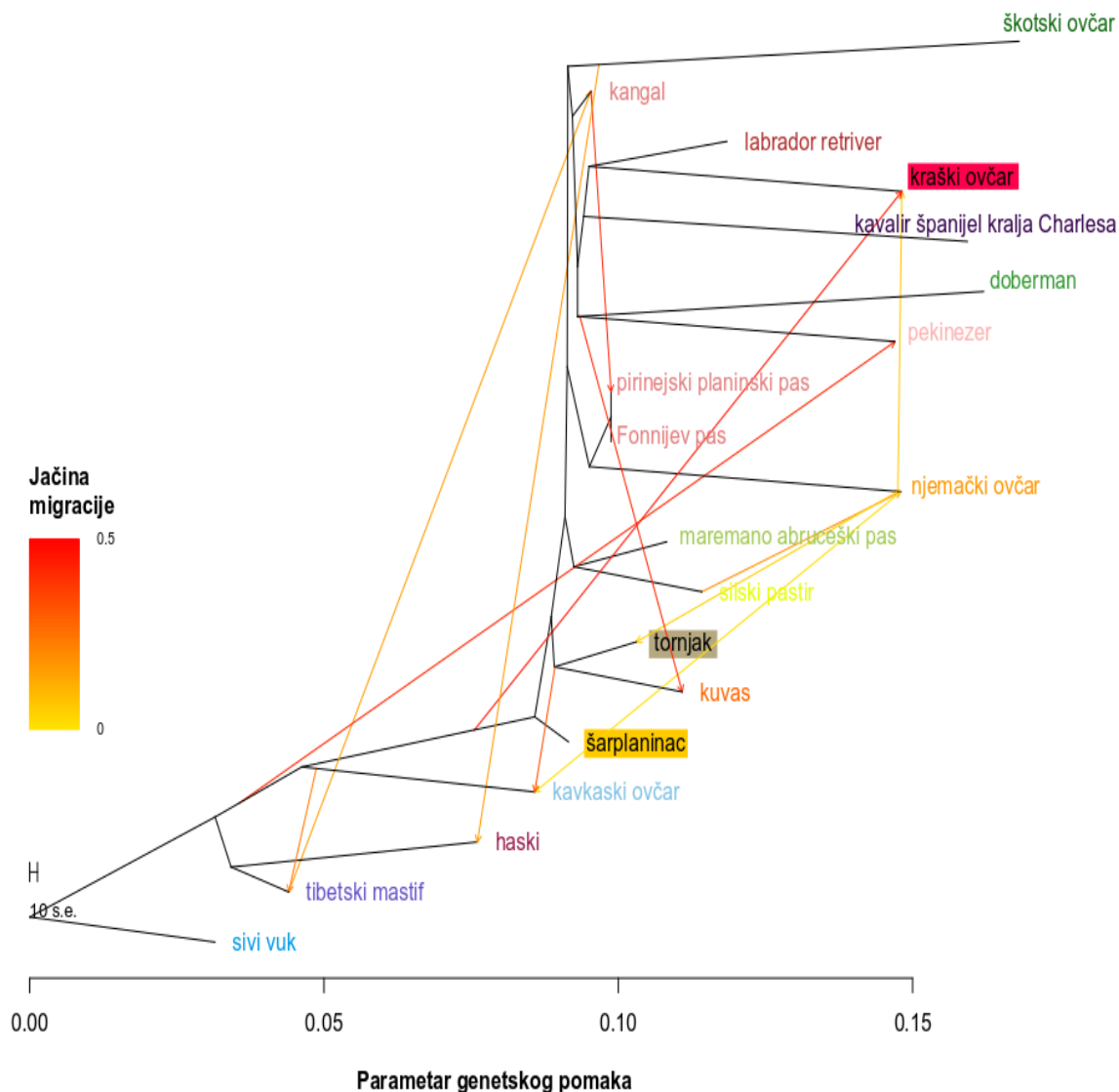


Slika 44. NeighborNet mreža bazirana na Neiievim udaljenostima pokazuje odnose 27 pasmina pasa i sivog vuka. Retikulacije na grafu pokazuju prošle hibridizacijske događaje među pasminama. Kratice pasmina su: erdeljski terijer (AIR), američki pit bul terijer (APB), američki stafordski terijer (AST), bedlington terijer (BET), graničarski terijer (BORT), bostonski terijer (BOST), bul terijer (BullT), kernski terijer (CT), foks terijer oštrodlaki (FTD), Jack Russell terijer (JRT), japanski španijel (Chin), irski plavi terijer (KBT), Lhasa Apso (LHAP), Norfolk terijer (NFT), Norwich terijer (NWT), pekinezer (PEKE), štakorski terijer (RATT), škotski terijer (SCT), Shih Tzu (SHI), svileni terijer (SILT), irski mekodlaki pšenični terijer (SCWT), stafordski bul terijer (SBT), tibetski španijel (TIBS), izvorni tibetski terijer (TTNA), zapadna populacija tibetskog terijera (TTEU), patuljasti foks terijer (TFT), zapadnoškotski bijeli terijer (WHWT), jorkširski terijer (YOR).

4.2.5 Treemix stablo na osnovi SNP čipova

Pomoću softvera Treemix modelirali smo dijelove populacije i protok gena između promatranih pasmina pasa i sivog vuka.

4.2.5.1 Treemix kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka



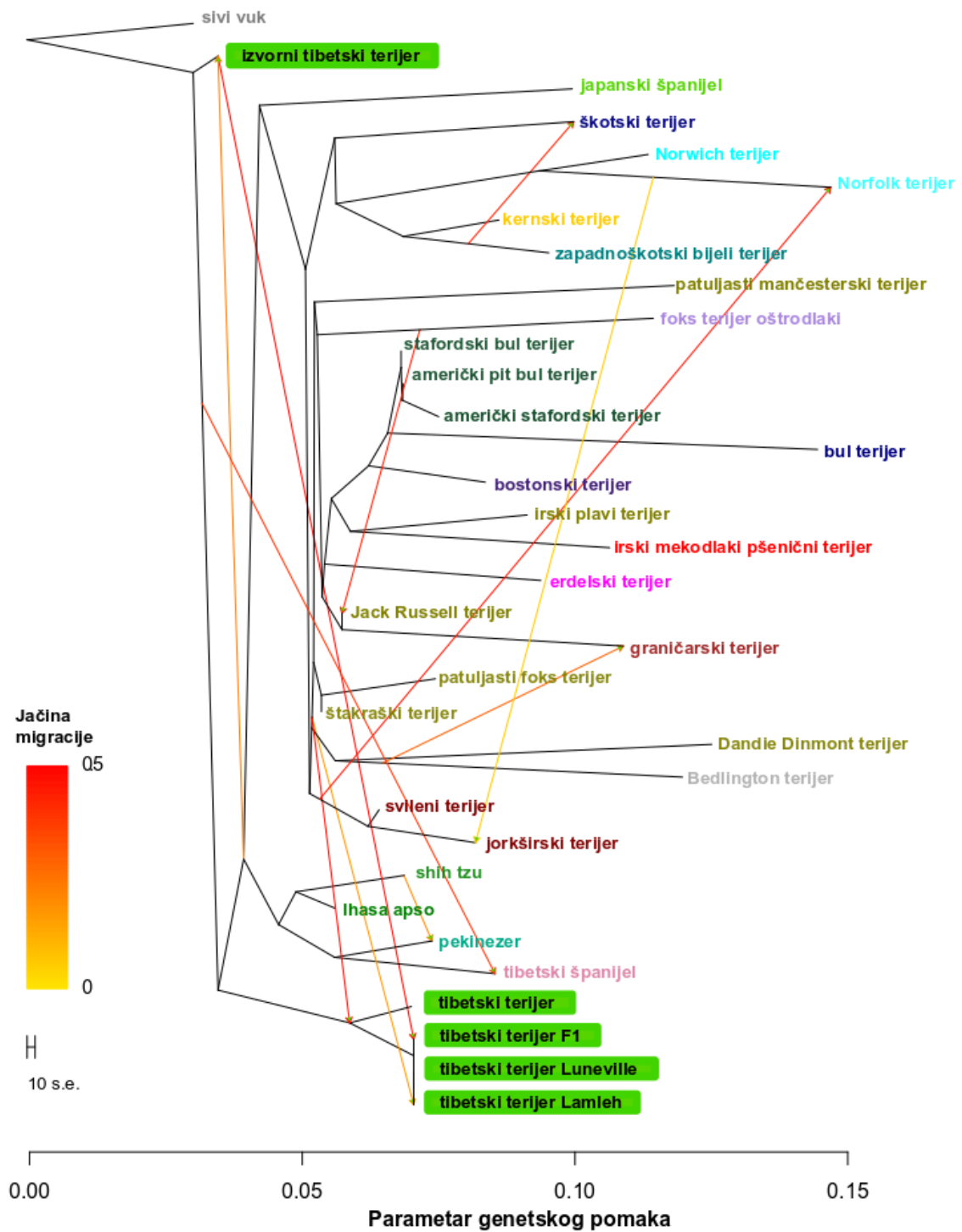
Slika 45. Stablo najveće vjerodostojnosti prikazuje migracije između pastirskih pasmina pasa i popularnih pasmina pasa.

Protok gena i migracije između kraškog ovčara, tornjaka, šarplaninca, sivog vuka i još 15 pasmina modelirali smo pomoću softvera Treemix (Slika 45). Naši rezultati pokazuju jaku migraciju pretka šarplaninca u kraškog ovčara. To je vjerojatno upravo prije spomenuti ilirski ovčar (predak i šarplaninca i kraškog ovčara, tj. staro ime za obje pasmine). Jaka migracija vidljiva je i od pretka dobermana u kuvasa, pretka kaskaskog ovčara u pekinezera i migracija kangala u pirinejskog planinskog psa.

4.2.5.2 Treemix stablo tibetskog terijera

Tibetski terijeri bili su podijeljeni na izvorne tibetske terijere, zapadne linije Lamleh i Luneville, F1 križance između zapadnih linija i izvorne populacije tibetskog terijera i uzorke tibetskog terijera preuzete iz baze Dryad (datadryad.org).

Naši rezultati na slici 46 podržavaju hipotezu da su izvorni tibetski terijeri bliži sivom vuku nego bilo kojoj drugoj pasmini u našoj zbirci. Otkriven je značajan protok gena iz izvorne populacije tibetskog terijera u linije Lamleh i Luneville, kao i tibetskih terijera iz studije (Shannon i sur., 2015) i generacije F1, što predstavlja križanje između izvornih i Lamleh tibetskih terijera. Otkrivene su i neke migracije gena od predaka terijera, ali vode samo do početka grane zapadnih linija. Osim toga, primijećeni su i neki drugi, manje značajni migracijski događaji koji vode samo do Lamleh linije. Oni bi mogli biti posljedica pretpostavke uzgajivača da tibetski terijer pripada skupini terijera i mogućih sporadičnih križanja tibetskih terijera s nekim drugim terijerima tijekom prošlog stoljeća. Pored toga, linije Lamleh i Luneville, F1 generacija križanja autohtonih i tibetskih terijera koji pripadaju Lamleh liniji, kao i uzorci tibetskih terijera preuzeti iz baze podataka Dryad grupirali su se s drugim tibetskim pasminama, a ne s terijerskim pasminama.

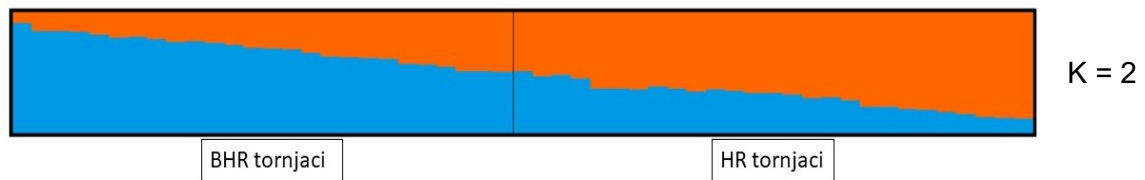


Slika 46. Stablo najveće vjerodostojnosti prikazuje migracije između azijskih patuljastih pasmina pasa (tibetskog terijera, japanskog španijela, shih tzu, lhasa apso, pekinezera i tibetskog španijela) i terijera.

4.3 Multivarijatne analize

4.3.1 STRUCTURE analiza mikrosatelita

4.3.1.1 STRUCTURE analiza mikrosatelita kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka

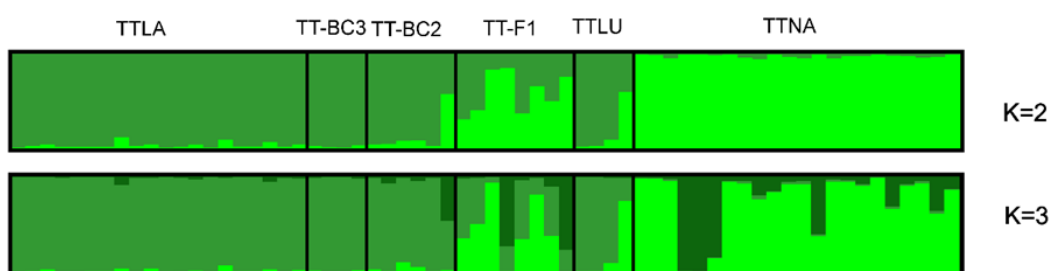


Slika 47. STRUCTURE analiza mikrosatelita tornjaka podijeljenih u bosanskohercegovačku i hrvatsku populaciju.

Rezultati STRUCTURE analize zasnovane na mikrosatelitskim podacima 53 uzorka tornjaka za $K = 2$ prikazani su na slici 47. Rezultati ove analize pokazuju da su svi psi unutar pasmine tornjak genetski vrlo slični, međutim ipak ih možemo podijeliti u dvije genetske populacije: hrvatsku (HR) i bosanskohercegovačku (BHR). Bosanskohercegovačka populacija tornjaka pokazala je oko 95 – 50 % doprinosa jedne genetske potpopulacije prikazane plavom bojom i 5 – 50 % doprinosa druge genetske potpopulacije prikazane narančastom bojom, dok je populacija hrvatskih tornjaka pokazala oko 50 – 90 % doprinosa genetske potpopulacije prikazane narančastom bojom i 10 – 50 % doprinosa druge genetske potpopulacije prikazane plavom bojom. Obje populacije pasmine pasa tornjak sastoje se od dviju potpopulacija prikazanih narančastom i plavom bojom.

STRUCTURE analiza mikrosatelita tornjaka odrađena je na $K = 1 - 5$, no određen je najbolji K postupkom Evanno delta K , pri čemu je za određivanje najvjerojatnije vrijednosti korišten $K = 2$. Stoga, iako se radi o jednoj pasmini možemo reći da se unutar nje nalaze dvije genetske populacije: bosanskohercegovačka i hrvatska.

4.3.1.2 STRUCTURE analiza mikrosatelita tibetskog terijera



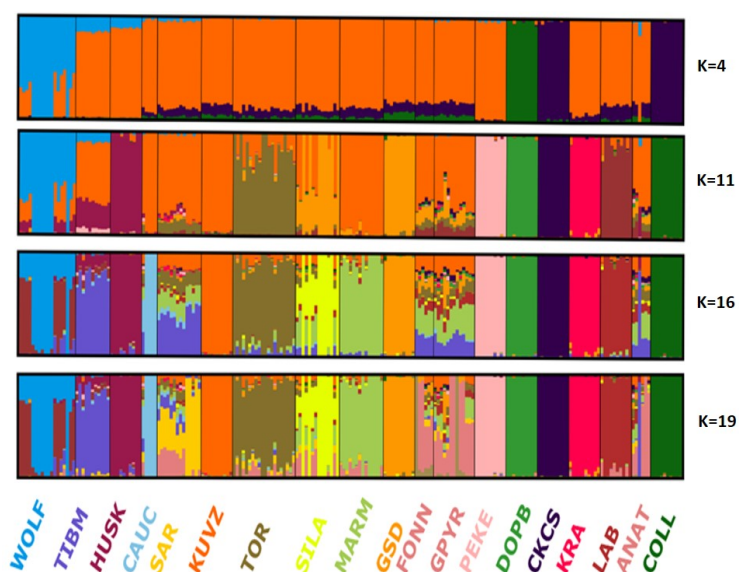
Slika 48. STRUCTURE analiza mikrosatelita. Jedinke su dodijeljene različitim klasterima pri različitim K vrijednostima. Kratice su TTLA – Lamleh linija tibetskog terijera, TTLU – Luneville linija tibetskog terijera, TTNA – izvorna populacija tibetskog terijera, TT-F1 – F1 generacija križanaca izvornih tibetskih terijera s Lamleh linijom, TT-BC2 – povratno križanje F1 generacije s Lamleh linijom, TT-BC3 – povratno križanje TT-BC2 generacije s Lamleh linijom.

Rezultati STRUCTURE analize zasnovane na mikrosatelitskim podacima za $K = 2$ i $K = 3$ prikazani su na slici 48. Ova analiza pokazala je da su psi unutar populacije tibetskog terijera genetski vrlo slični. Populacija TTNA pokazala je oko 95 % doprinosa jedne potpopulacije i 5 % doprinosa druge potpopulacije. Populacija TTEU je pokazala suprotan rezultat, dok je populacija TT-F1 generacije križanja pokazala doprinose između 20 % i 80 % svake potpopulacije. Populacija TT-BC2 pokazala je 90 % druge potpopulacije, a populacija TT-BC3 gotovo 100 % doprinosa genotipa koji prevladava u zapadnoj potpopulaciji.

Najbolji K postupkom Evanno delta K korišten je za određivanje najvjerojatnije vrijednosti $K = 3$. Stoga, iako se razlikuju, naših šest populacija tibetskih terijera zapravo se sastoje od tri genetska klastera - izvornog tibetskog i zapadnog klastera, dok izvorni klaster pokazuje i neke strukture unutar klastera. Genetska osnova populacije TTNA šira je od osnove zapadnih TT, ali se ta činjenica ne odražava proporcionalno u fenotipu. Postojanje šireg genetskog bazena u izvornoj populaciji sigurno je relevantno za moguće sprječavanje daljnjeg porasta homozigotnosti i potencijalnog rizika od genetskih bolesti.

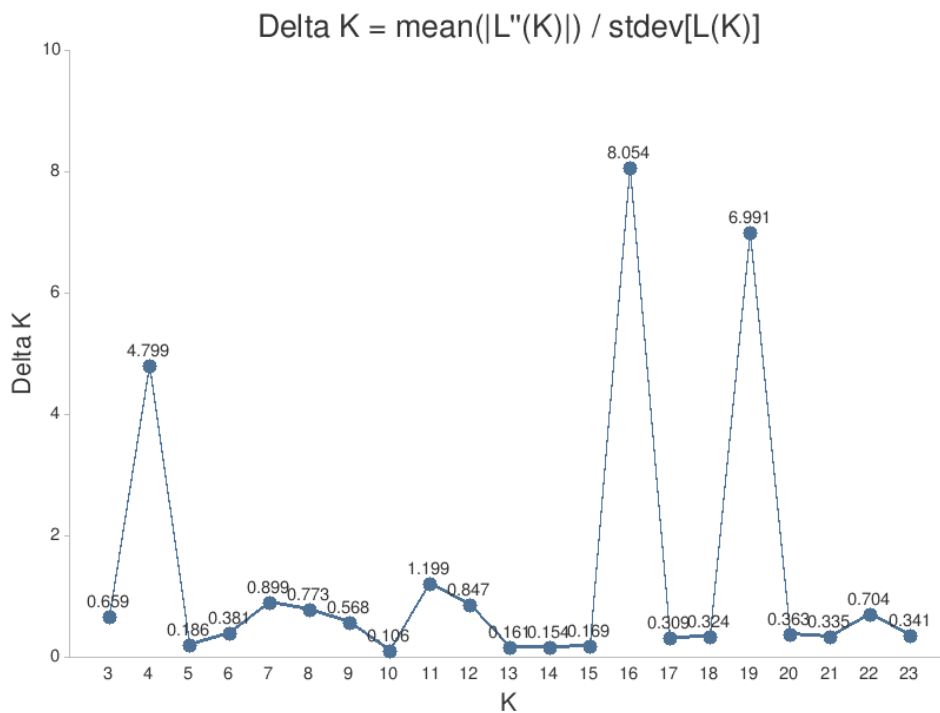
4.3.2 STRUCTURE analiza SNP čipova

4.3.2.1 STRUCTURE analiza SNP čipova kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka



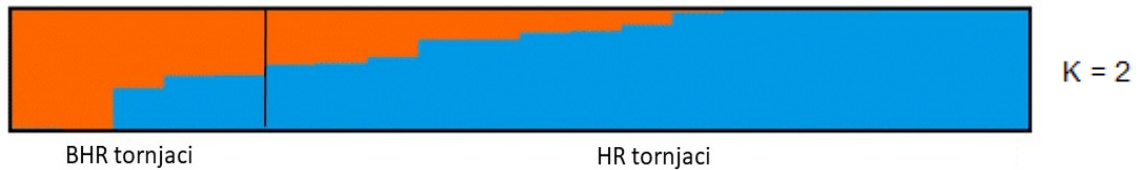
Slika 49. Bayesovo grupiranje izvedeno softverom CLUMPAK na CanineHD BeadChip podacima između LGD-ova vuka i nekih popularnih pasmina pasa. (LGD-ovi: kangal (ANAT), kraški ovčar (KRA), pirinejski planinski pas (GPYR), Fonnijev pas (FONN), maremano abruceški pastirski pas (MARM), silski pastir (SILA), tornjak (TOR), kuvas (KUVZ), šarplaninac (SAR), kavkaski ovčar (CAUC), tibetski mastif (TIBM), popularne pasmine: škotski ovčar (COLL), labrador retriever (LAB), kavalir španijel kralja Charlesa (CKCS), doberman (DOPB), pekinezer (PEKE), njemački ovčar (GSD), haski (HUSK), sivi vuk (WOLF)).

Na STRUCTURE grafikonu (Slika 49) dobivenog analizom SNP čipa kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka, drugih LGDova i nekih popularnih pasmina pasa, je svaki skup označen drugačijom bojom, a svaki pojedinac prikazan je kao vertikalna traka podijeljena u najviše K segmenata u boji s visinama koje su proporcionalne genotipskim članstvima. Kraški ovčar predstavljen je u intenzivno ružičastoj boji, tornjak u maslinastozelenoj, a šarplaninac u svijetlonarančastoj. Kraški ovčar ima najveću uniformnost, no unatoč tome vidljive su i male proporcije druge boje koje predstavljaju genetske elemente nekih drugih populacija (labrador retriever, njemački ovčar, pirinejski planinski pas i kangal). Kod tornjaka prisutno je nešto više proporcija boja koje su nađene i u drugim populacijama (pirinejski planinski pas, kangal, šarplaninac, tibetski mastif, kavkaski ovčar, maremano abruceški pastirski pas, Sila pastirski pas, doberman, kraški ovčar, kuvas, haski, pekinezer i škotski ovčar). Šarplaninac je najmanje uniforman i kod njega su prisutne veće proporcije boja koje su nađene i u drugim populacijama (kangal, pirinejski planinski pas, tibetski mastif, kavkaski ovčar, maremano abruceški pastirski pas, tornjak, kraški ovčar, kuvas, haski, Sila, njemački ovčar, labrador retriever, doberman, škotski ovčar, kavalir španijel kralja Charlesa).



Slika 50. Najinformativnije K vrijednosti procijenjene Evanno delta K postupkom za STRUCTURE analizu SNP čip podataka za skup s kraškim ovčarem, šarplanincem i tornjakom.

Najinformativnije K vrijednosti ($K = 4$, $K = 11$, $K = 16$ i $K = 19$) procijenjene su postupkom Evanno delta K (Slika 50), a STRUCTURE grafikon koji se temelji na tim K vrijednostima prikazan je na slici 49.

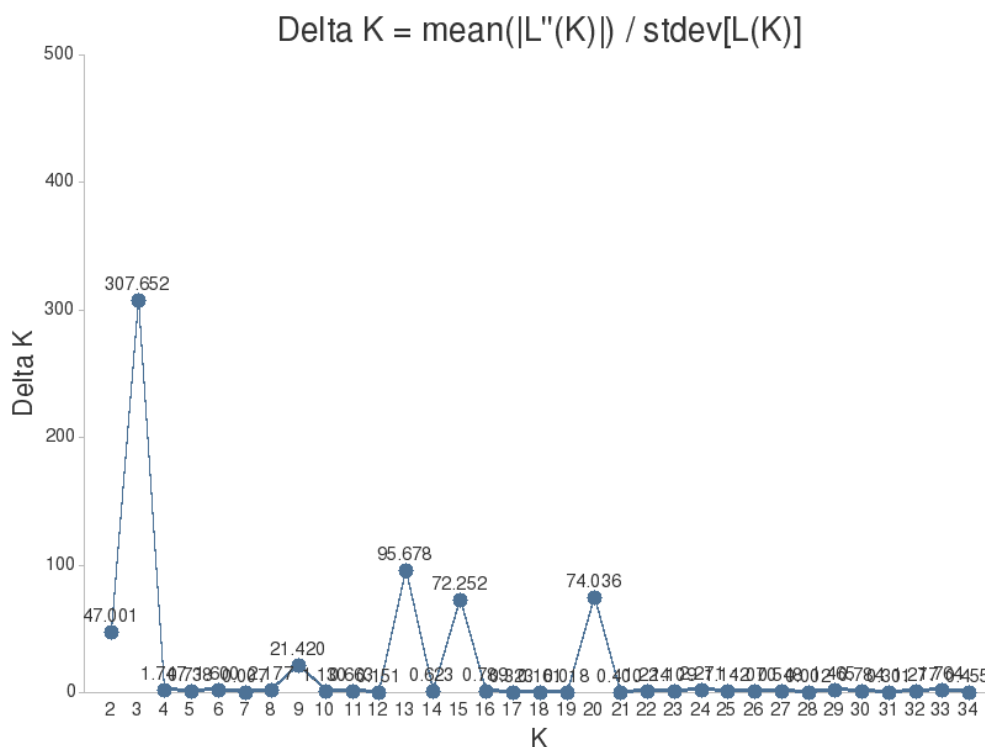


Slika 51. STRUCTURE analiza SNP čip podataka tornjaka

STRUCTURE analiza samo dvije potpopulacije (bosanskohercegovačke i hrvatske) tornjaka zasnovana na podacima SNP čipa pokazuje sličnu podstrukturu obiju potpopulacija. Na ovom prikazu bosanskohercegovački tornjaci pokazuju od 100 % do 95 % doprinosa narančaste genetske potpopulacije i određene jedinke od 40 do 50 % plave potpopulacije, dok hrvatski tornjaci pokazuju od 55 % do 100 % doprinosa plave populacije i kod nekih jedinki od 5 do 45 % narančaste populacije. Obje potpopulacije sadrže određeni udio narančaste i plave genetske populacije, stoga, iako je to jedna pasmina pasa, unutar nje možemo promatrati dvije potpopulacije određene geografskim položajem. Rezultati slike 51 zasnovani na analizi SNP čipova sukladni su rezultatima dobivenim analizom mikrosatelita sa slike 47. Najinformativnija K vrijednosti ($K = 2$) procijenjena je postupkom Evanno delta K, a STRUCTURE grafikon koji se temelji na toj K vrijednosti prikazan je na slici 51.

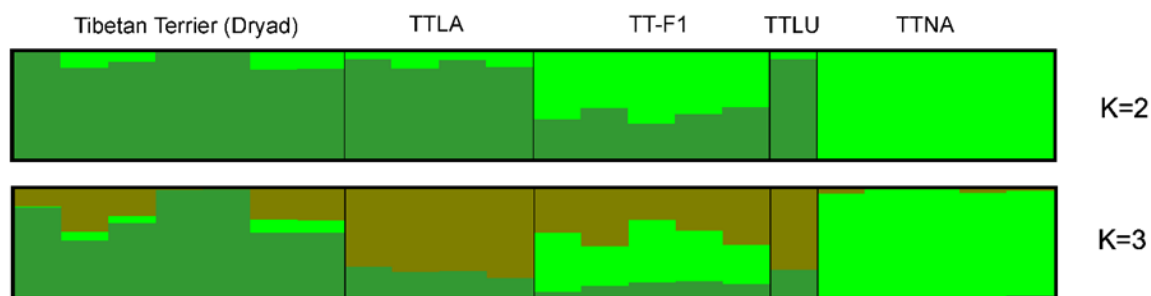
4.3.2.2 STRUCTURE analiza SNP čipova tibetskog terijera

Na STRUCTURE grafikonu (Slika 52) dobivenom analizom SNP čipova tibetskog terijera, drugih terijera i pasa za pratnju, je svaki skup pasa označen drugačijom bojom, a svaki pojedinac prikazan je kao vertikalna traka podijeljena u najviše K segmenata u boji s visinama koje su proporcionalne genotipskim članstvima. Izvorni tibetski terijeri predstavljeni su u svijetlozelenoj boji. Zapadne linije tibetskih terijera pokazuju veću uniformnost od izvornih tibetskih terijera u kojima su vidljive i druge boje koje predstavljaju genetske elemente prisutne i u drugim populacijama (shih tzu, sivi vuk, tibetski španijel, japanski chin, zapadna populacija tibetskog terijera, pekinezer i neki terijeri – JRT, RATT, TMT, TFT, KBT, DDT, SILT).



Slika 53. Najinformativnije K vrijednosti procijenjene Evanno delta K postupkom za STRUCTURE analizu SNP čip podataka s tibetskim terijerom.

STRUCTURE analiza samo pet potpopulacija tibetskog terijera zasnovana na podacima SNP čipa pokazuje sličnu podstrukturu svih potpopulacija. Zbog izrazito uskog grla u podrijetlu populacije zapadnih tibetskih terijera, sadašnja populacija zapadnog TT-a može se jasno razlikovati od izvorne populacije. Generacija F1 pokazuje prisutnost obaju genskih bazena (Slika 54).

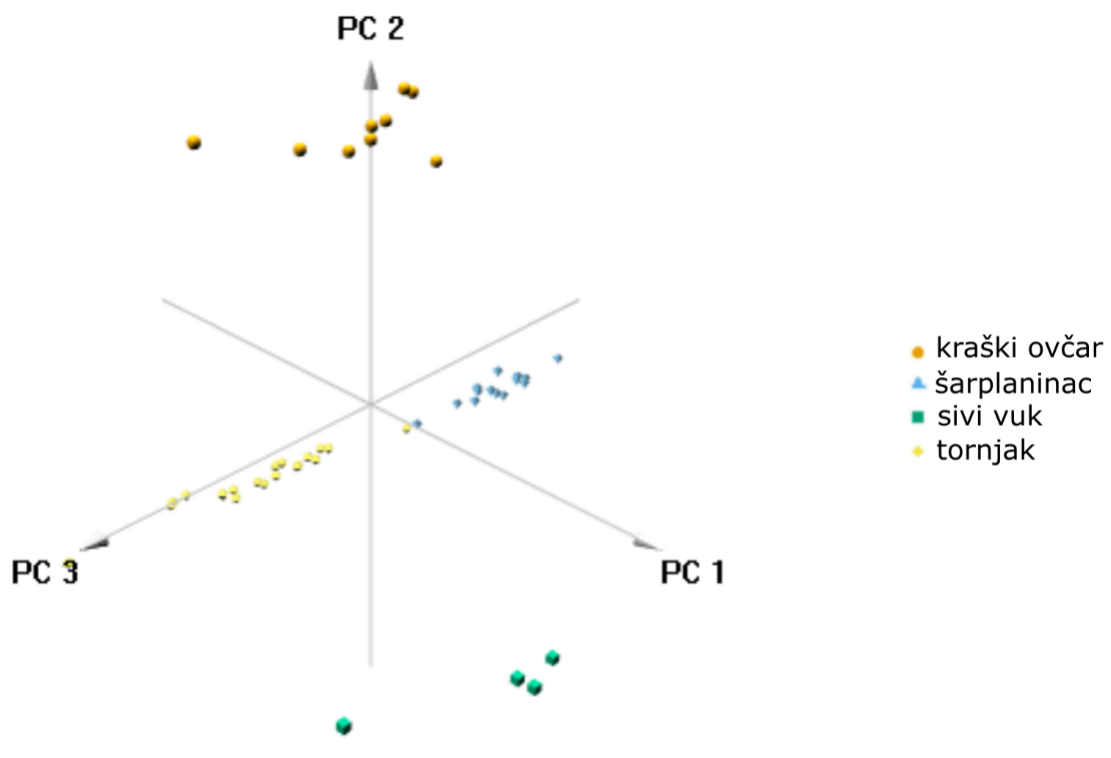


Slika 54. STRUCTURE analiza SNP čip podataka tibetskog terijera.

4.3.3 Analiza glavnih komponenti (PCA) na osnovi mikrosatelita

Proveli smo analizu glavnih komponenti (Principal component analysis – PCA) koristeći mikrosatelite kako bismo provjerili srodnost promatranih pasmina i linija promatranih pasmina.

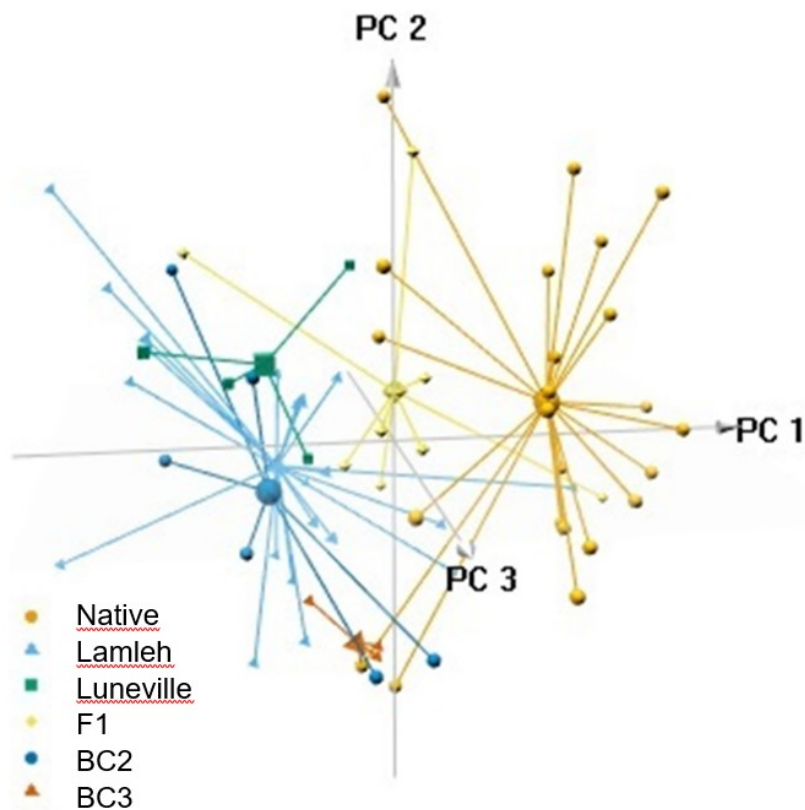
4.3.3.1 Analiza glavnih komponenti (PCA) mikrosatelita kraškog ovčara, šarplaninca, tornjaka i sivog vuka



Slika 55. PCA analiza mikrosatelita kraškog ovčara, šarplaninca, tornjaka i sivog vuka.

Rezultati PCA analize na slici 55 prikazuju jasno odijeljene pasmine, klasterirane u zasebne klasterne, međutim jednog tornjaka smještaju bliže šarplaninskom klasteru. Na slici je vidljivo da su tornjaci genetski bliži šarplanincu nego kraškom ovčaru tako što se i tornjaci i šarplaninci smještaju u zajedničku liniju na jednom dijelu grafa, dok se kraški ovčar odvojio od njihove ravnine i stvorio zaseban klaster na vrhu grafa. Vukovi su udaljeni od svih pasmina i tvore zaseban klaster na samom dnu prikaza.

4.3.3.2 Analiza glavnih komponenti (PCA) mikrosatelita tibetskog terijera

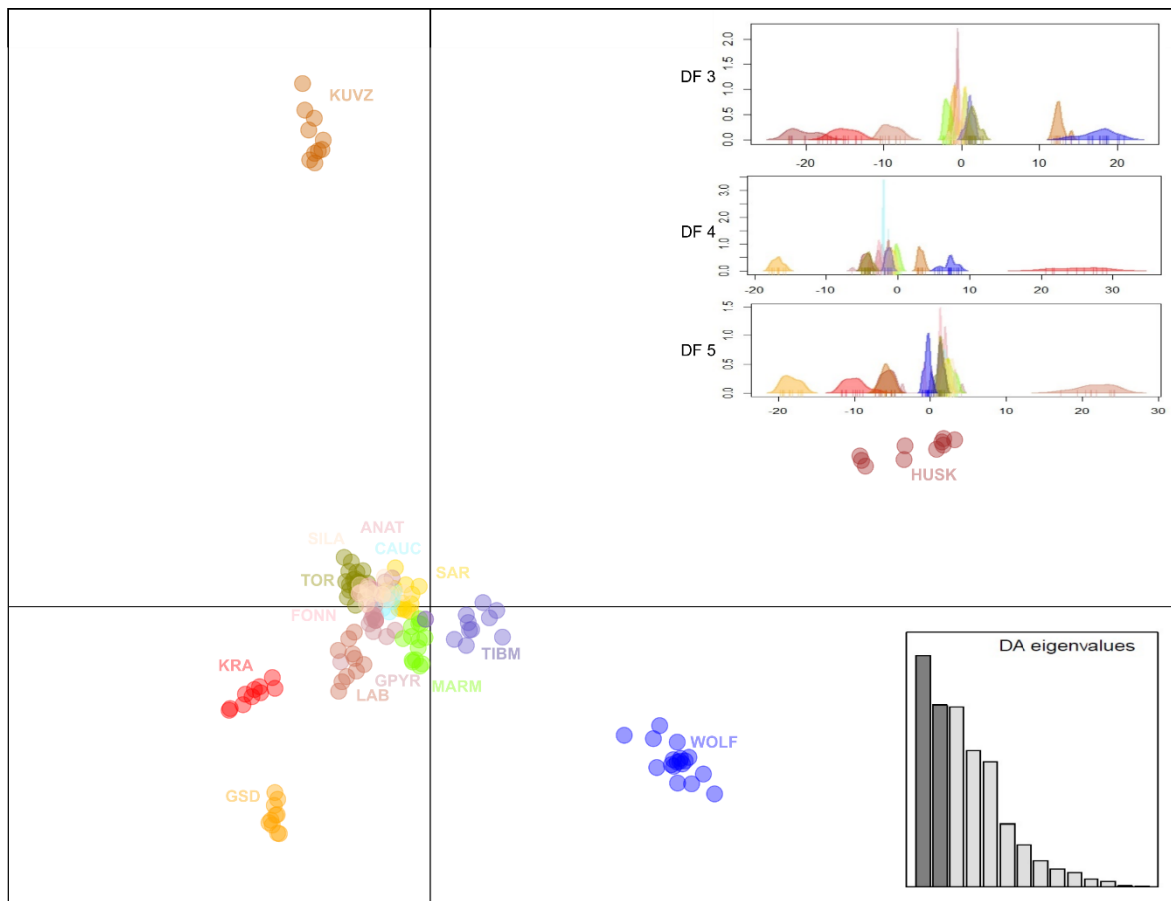


Slika 56. PCA analiza mikrosatelita tibetskog terijera. Jasno pokazuje genetsku razliku zapadne i izvorne populacije tibetskog terijera.

Koristeći mikrosatelite proveli smo analizu glavnih komponenti (Principal component analysis – PCA). Rezultat na slici 56 pokazao je da postoji razlika između zapadne populacije u koju pripadaju i Lamleh i Luneville linija i izvorne populacije tibetskog terijera iz Tibeta. Razlika je vidljiva tako što se zapadni uzorci grupiraju na lijevoj strani ovog grafa, dok se na desnoj strani grupiraju uzorci uzeti iz izvorne populacije tibetskog terijera. Zapadne linije (Lamleh i Luneville) grupiraju se zajedno u isti klaster, dok se križanci F1 generacije smještaju u sredinu grafa, a povratna križanja BC2 i BC3 smještaju se bliže zapadnom klasteru budući da su povratno križana s Lamleh linijom.

4.3.4 DAPC analiza SNP čipova kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka

DAPC analiza izrađena na podacima SNP čipa prikazuje grupiranja nekoliko pasmina pasa i vukova (Slika 57). Izabrane su pastirske pasmine, njemački ovčar i kuvasz, kao predstavnici ovčara, labrador kao veliki lovni pas i haski kao predstavnih primordijalnih polarnih pasa kako bi se vidio genetski odnos među njima. Na prve dvije komponente tornjak se grupira zajedno s Fonnijevim psom, labrador retrieverom, kangalom, kavkaskim ovčarom, šarplanincem, pirinejskim planinskim psom i maremano abruceškim pastirskim psom, dok im je jako blizu smješten i tibetski mastif. Kraški ovčar stvara zaseban klaster relativno blizu ove grupe pasmina pasa, a odmaknut je prema klasteru njemačkog ovčara koji se također grupirao zasebno i nešto dalje od ove grupe pasmina. Vukovi stvaraju zaseban klaster s desne strane grafa, dok kuvasz tvori najudaljeniji klaster na vrhu grafa. Haske je najdalje pozicioniran u desnu stranu grafa, no to je pasmina koja pripada među špiceve i primitivne pse te nema niti postankom niti svrhom dodirne točke s drugim pasminama na ovom grafu.



Slika 57. DAPC analiza genotipa SNP-a vuka i pasa. Prve dvije komponente pokazale su se kao PCA. Genotipovi pasa i vukova projicirani su na treću, četvrtu i petu funkciju diskriminatorne PC analize (DAPC izračunato u ADEGENET-u). (LGD-ovi: ANAT – kangal, KRA – kraški ovčar, GPYR – pirinejski planinski pas, FONN – Fonnijev pas, MARM – maremano abruceški pastirski pas, SILA – silski pastir, TOR – tornjak, KUVZ - kuvas, SAR – šarplaninac, CAUC – kavkaski ovčar, TIBM – tibetski mastif, popularne pasmine: COLL – škotski ovčar, LAB – labrador retriever, CKCS – kavalir španijel kralja Charlesa, DOBP – doberman, PEKE – pekinezer, GSD – njemački ovčar, HUSK – haski).

Na trećoj, četvrtoj i petoj DAPC varijabli analize tornjaci ostaju u najvećoj grupi pasmina pasa skupa sa šarplanincem, dok kraški ovčar mijenja položaje: na trećoj je između labrador retrievera i pirinejskog planinskog psa, na četvrtoj odvojen od svih na desnoj strani, a njemački ovčar je tako odvojen na lijevoj, a na petoj je smješten između njemačkog ovčara i labradora i pirinejskog planinskog psa.

4.4 Genomski koeficijent inbridinga procijenjen na temelju ROH analiza

4.4.1 Inbriding kraškog ovčara, tornjaka i šarplaninca

Genomski koeficijent inbridinga kod kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka procijenili smo na temelju ROH analiza. Usporedba procijenjenih koeficijenata inbridinga u populaciji pastirskih pasmina pasa s nekim popularnim pasminama pasa pokazuje nizak koeficijent inbridinga (FROH) u usporedbi s nekim popularnim pasminama pasa (Slika 58). Procijenili smo raspodjelu ROH-a po duljini, što može otkriti razlike u vremenu kada se izgubila raznolikost.

Tornjaka 0,025 i šarplaninca 0,020 karakterizira nizak stupanj i udaljenih i bliskih ROH-ova, dok kraški ovčar ima nešto viši stupanj. Pastirski psi u ovoj analizi generalno pokazuju slične rezultate i kod udaljenih i kod bliskih ROH-ova. Kod kraškog ovčara postoji nešto viši udio homozigotnosti u udaljenim ROH-ovima, što ukazuje na nedavni inbriding.

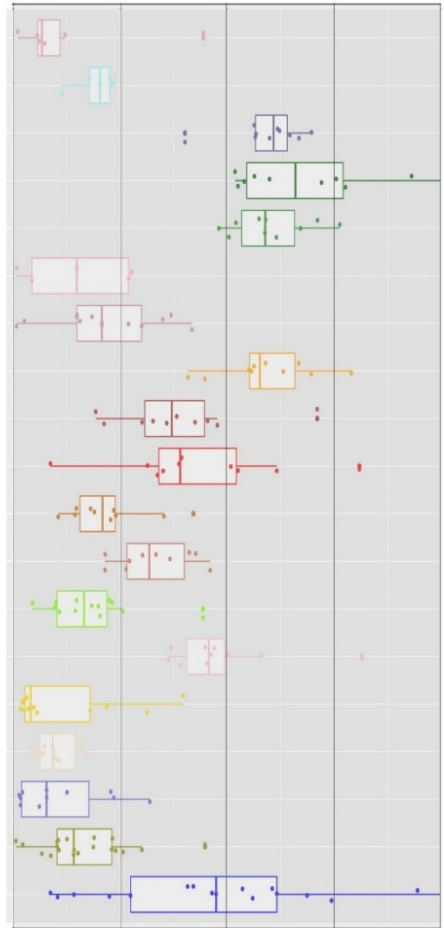
Za nas je bio najzanimljiviji prikaz ROH-a od 2 do 5 Mb budući da on pokazuje inbriding koji se vjerojatno dogodio prije 10 – 25 generacija. Na temelju tih rezultata možemo vidjeti kako niske udjele ROH-ova imaju skoro svi pastirski psi, dok popularne pasmine pasa imaju više udjele ROH-ova (CKCS 0,045, COLL 0,075, DOBP 0,072, GSD 0,065, PEKE 0,060).

Niska razina inbridinga pastirskih pasmina pasa, čija uzgojna praksa podržava miješanje, rezultat je veće efektivne veličine populacije u usporedbi s populacijama popularnih pasmina pasa koje imaju znatno višu razinu inbridinga, vrlo često prekomjerno korištenje malog broja popularnih parnjaka čime je dodatno smanjen u početku nastajanja pasmina ionako mali genetski bazen i strogu uzgojnu praksu koja podržava linijska parenja i određene odlike pasa zapisane u strogim standardima. Osim toga, ti popularni psi sve su češće kućni psi za razbibrigu ili znak prestiža, pa ljudi manje obraćaju pažnju na njihovu fizičku funkcionalnost, dok je za pastirske pse i dalje bitno njihovo zdravlje kako bi mogli neometano obnašati svoj posao.

PASMINE

-  ANAT
-  CAUC
-  CKCS
-  COLL
-  DOBP
-  FONN
-  GPYR
-  GSD
-  HUSK
-  KRA
-  KUVZ
-  LAB
-  MARM
-  PEKE
-  SAR
-  SILA
-  TIBM
-  TOR
-  WOLF

2Mb



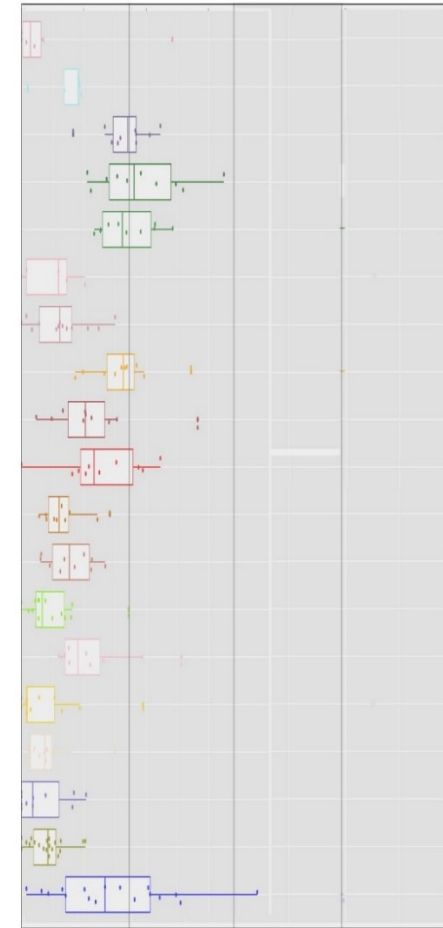
0.00 0.05 0.10 0.15 0.20

2-5Mb



0.00 0.05 0.10 0.15 0.20

5Mb

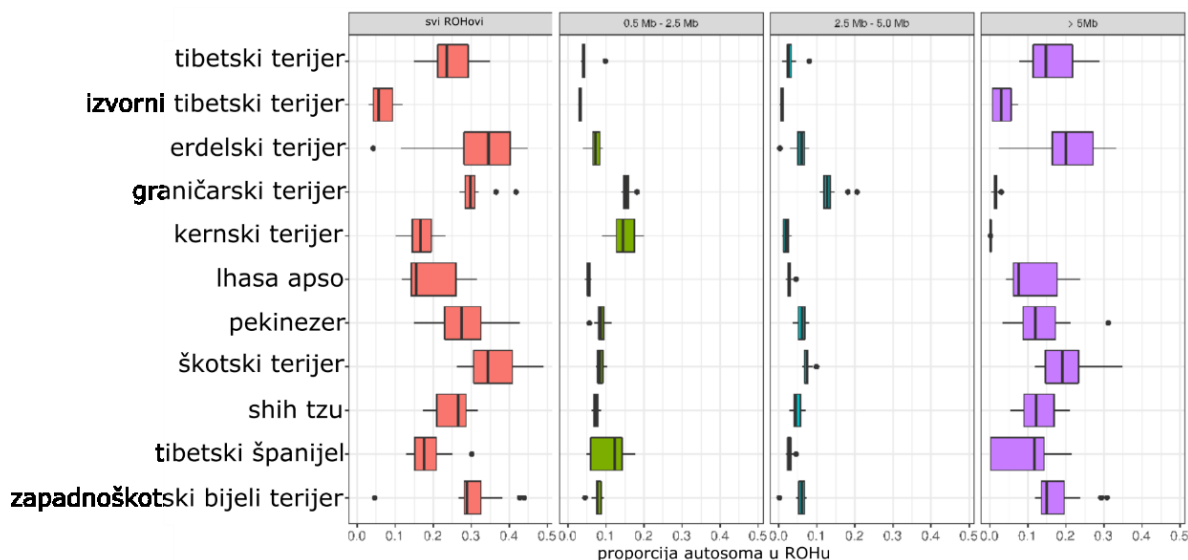


0.00 0.05 0.10 0.15 0.20

Slika 58. Proporcija autozigotnosti u ROH-u LGD-ova, drugih popularnih pasmina pasa i vuka. Kratice pasmina su: LGD-ovi: ANAT - kangal, CAUC - kavkaski ovčar, FONN – Fonijev pas, GPYR - pirinejski planinski pas, KRA - kraški ovčar, KUVZ – kuvasz, MARM - maremano abruceški pastirski pas, SILA – silski pastir, SAR – šarplaninac, TIBM – tibetski mastif, TOR - tornjak, popularne pasmine pasa: CKCS - kavalir španijel kralja Charlesa, COLL – škotski ovčar, DOBP - doberman, GSD – njemački ovčar, HUSK – sibirski haski, LAB – labrador retriever, PEKE – pekinezer i WOLF – sivi vuk.

4.4.2 Inbriding tibetskog terijera

Procijenili smo genomski koeficijent inbridinga na temelju ROH analiza. Usporedba procijenjenih genomskih koeficijenata inbridinga u izvornoj populaciji tibetskog terijera s nekim drugim populacijama pasmina otkrila je vrlo nizak koeficijent inbridinga procijenjen ROH analizom (FROH) u usporedbi s nekim drugim pasminama (Slika 59).



Slika 59. Proporcija autozigotnosti u ROH-u tibetskog terijera i drugih pasmina pasa.

Izvornu populaciju tibetskog terijera karakterizira nizak stupanj udaljenog ROH-a, dok zapadna populacija ima znatno viši stupanj udaljenog ROH-a, ali je i ukupan udio genoma obuhvaćenog ROH-om (FROH) u izvornoj populaciji 0,07, dok u zapadnoj populaciji vrijednost FROH iznosi 0,24. U zapadnoj populaciji tibetskog terijera postoji viši udio homozigotnosti u dugim ROH-ovima što ukazuje na nedavni inbriding. Na temelju ove analize izvorna populacija tibetskog terijera pripada populaciji pasa s najnižim stupnjem inbridinga, što povećava vrijednost populacije kao genetskog resursa.

Niska razina inbridinga izvornih tibetskih terijera čija uzgojna praksa podržava miješanje rezultat je veće efektivne veličine populacije u usporedbi sa zapadnom populacijom tibetskih terijera koja ima znatno višu razinu inbridinga zbog malog genetskog bazena i stroge uzgojne prakse koja podržava linijska parenja.

5 RASPRAVA

Prilikom izrade ovog doktorskog rada utemeljenog na istraživanju CR mtDNA kod pasa vodili smo se zlatnim pravilom broja 30. Naravno, što je veći broj uzoraka, to će rezultat biti relevantniji, a pogreška manja. Tako smo i mi težili da od svake od promatranih pasmina imamo sakupljenih barem 30 uzoraka, što često nije lako postići budući da su psi najčešće u privatnom vlasništvu, a vlasnici ponekad nisu skloni davati informacije o svojim kućnim ljubimcima. Pa ipak, na samom početku ovog rada sakupili smo 50 uzoraka tornjaka, 50 šarplaninaca, 200 kraških ovčara i 64 tibetskih terijera. Kako bismo još povećali broj uzoraka pasa radi veće i kvalitetnije usporedbe, za rad o kraškom ovčaru, tornjaku i šarplanincu korišteno je 256 uzoraka pasa iz 23 pasmine i sedam uzoraka apeninskih vukova iz rada Talenti i sur. (2018) te 1346 uzoraka pasa iz 161 pasmine iz rada Parker i sur. (2017), dok je za rad o tibetskim terijerima povučeno 5406 uzoraka pasa iz 163 pasmine nukleotidnih sljedova SNP biljega iz istraživanja Shannon i sur., (2015) dostupnih u repozitoriju Dryad. Broj pasa po pasminama varirao je od 1 do 732.

Za potrebe ovog doktorskog rada koristili su se uzorci dlake pasa i vuka. Prosjeci koncentracije DNA kretali su se od 7,36 ng/μl kod tibetskog terijera do 93,94 ng/μl kod šarplaninca, dok je prosjek omjera čistoće DNA A260/A280 bio veći od dva kod tornjaka, tibetskog terijera i vuka. Bez obzira na odstupanje koncentracije i čistoće DNA od preporučene, pripremljene su biblioteke 87 uzoraka kraškog ovčara, 81 uzorka šarplaninca, 100 uzoraka tornjaka, 62 uzorka tibetskog terijera i četiri uzorka vuka te im je uspješno određen nukleotidni slijed – dlaka se pokazala kao dobar izvor za pseću DNA.

5.1 Genetička varijabilnost kraškog ovčara, tornjaka i šarplaninca

Kraški ovčari, tornjaci i šarplaninci pripadaju u svoju skupinu pastirskih pasa i primjer su pasmina pasa naših prostora koje imaju svoj živi genetski bazen iz kojeg potječu svi psi tih pasmina rašireni po svijetu. Na početku formiranja pasmine kraški ovčar i šarplaninac bili su jedinstvena pasmina zvana ilirski ovčar, no kasnije su odvojeni u zasebne pasmine, dok je tornjak bio podijeljen u dvije pasmine – bosanskohercegovačku i hrvatsku, no kasnije je spojen u jedinstvenu bosanskohercegovačko-hrvatsku pasminu.

Pri analizi genetske varijabilnosti kontrolne regije mitohondrijske DNA kraškog ovčara, tornjaka i šarplaninca kao rezultat dobili smo tri haplogrupe koje su jasno odijeljene i dok su tornjaci pripali dvjema haplogrupama, šarplaninci su pripali u sve tri haplogrupe zajedno s drugim pasminama pasa. Naš rezultat u skladu je s rezultatima iz prijašnjih radova o mtDNA pasa. Općenito, psi često nisu grupirani u pripadajuću pasminu prema svojim haplogrupama mtDNA zbog dijeljenja haplo-tipa (Suárez et al. 2013), a učestalosti haplotipova mogu se razlikovati između određenih pasmina i cijelog genskog bazena pseće mtDNA, kao i među pasminama (Suárez i sur., 2013).

Filogenetskom analizom 18 mikrosatelita predloženih po ISAG-u kraškog ovčara, tornjaka i šarplaninca dobili smo rezultate kojima su sve tri pasmine međusobno jasno odijeljene, a opet svi psi iste pasmine jasno pripadaju istom klasteru. Zbog malog broja pasmina, moglo bi se prikupiti malo podataka o njihovim odnosima, ali i naši uzorci pokazali su da svaka pojedina pasmina pokazuje svoj jedinstveni uzorak markerskih alela i podržavaju hipotezu da je unutar pasmine mnogo manje varijacija nego kod različitih vrsta, baš kao i u radu autora Irion i sur. (2003). Zanimljivo je i da smo STRUCTURE analizom dobili rezultate kojima potvrđujemo postojanje dviju populacija pasmine tornjak i time dijelimo pasminu na hrvatske i bosanskohercegovačke pse baš kao što su svojim analizama pokazali i rezultati Ceh i Dovc (2014).

Za još jasnije rezultate analizirali smo SNP čipove kraškog ovčara, tornjaka i šarplaninca. Uočena je jaka migracija pretka šarplaninca u kraškog ovčara i taj predak mogao bi biti upravo ilirski ovčar. Analizom SNP čipova kraški ovčar pokazao je najveću uniformnost, tornjak je nešto manje uniforman, dok je šarplaninac najmanje uniforman, što ukazuje na upliv i drugog genetskog materijala u populaciju te pasmine. STRUCTURE analiza SNP čipova potvrdila je naše rezultate dobivene na mikrosatelitima i podijelila tornjake na hrvatsku i bosanskohercegovačku populaciju iste pasmine. Na prve dvije komponente diskriminacijske analize glavnih komponenata (DAPC) izrađene na SNP čipovima tornjak se grupira zajedno s šarplanincem, drugim pastirskim pasminama, ali i labrador retrieverom. Kraški ovčar ne pripada u taj klaster, ali je ipak postavljen vrlo blizu, no

ipak je primaknut njemačkom ovčaru. Taj rezultat sukladan je teorijskim navodima da se kraški ovčar u prošlosti križao s njemačkim ovčarem (KZS, 2019).

Koeficijent inbridinga kod kraškog ovčara, šarplaninca i tornjaka procijenili smo na temelju ROH analiza. Na temelju rezultata ROH-a od 2 do 5 Mb, a koji pokazuje inbriding koji se vjerojatno dogodio prije 10 – 25 generacija, možemo vidjeti da skoro svi parstirski psi imaju niske udjele ROH-ova, dok popularne pasmine pasa imaju više udjele ROH-ova. Niska razina inbridinga pastirskih pasmina pasa, čija uzgojna praksa podržava miješanje, rezultat je veće efektivne veličine populacije (Ceh i Dovc, 2014) u usporedbi s populacijama popularnih pasmina pasa koje imaju znatno višu razinu inbridinga, vrlo često prekomjerno korištenje malog broja popularnih parnjaka čime je dodatno smanjen u početku nastajanja pasmina ionako malen genetski bazen i stroga uzgojna praksa koja podržava linijska parenja i određene odlike pasa zapisane u strogim standardima.

5.2 Genetička varijabilnost tibetskog terijera

Tibetski terijer jedna je od rijetkih pasmina pasa čija izvorna populacija još uvijek postoji u Tibetu, a koja predstavlja izvorni genetski bazen iz kojeg potječe cjelokupna moderna, zapadna populacija pasmine tibetskih terijera. Zapadna populacija je na početku svog nastanka doživjela vrlo usko grlo, što je rezultiralo relativno brzim porastom inbridinga i pojavom nekoliko zdravstvenih problema. Štoviše, kada je zapadna populacija te pasmine uspostavljena na zapadu, na temelju fenotipskih karakteristika pasmina je postavljena unutar grupe terijera. Prema populacijsko-genetičkim istraživanjima, većina terijera pripada „modernom / lovačkom“ klasteru koji je razvijen iz istog europskog genetskog bazena predaka iz 19. stoljeća, dok tibetski terijer pripada starijoj grupi azijskih i afričkih pasa zajedno s pekinezerom (Ostrander i sur., 2007). Nekoliko radova klasificiralo je tibetskog terijera kao drevnu pasminu zbog visoke razine divergencije u odnosu na ostale pasmine pasa. Smatra se da je pasmina tibetski terijer nastala prije oko 500 godina i da je bila visoko povezana s izvornim pripitomljavanjem pasa (Larson i sur., 2012). Stoga se tibetski terijer može smatrati jednom od pasmina bazalnih linija domaćeg psa i kao živi prototip pasa predaka. Nedavni rad Choi i sur. (2017), koji se koncentrirao na podrijetlo, raznolikost i populacijsku strukturu korejskih pasa uključuje tibetske terijere i podupire genetsku povezanost između korejskog vuka i tibetskih terijera. Taj rad pokazuje neighbour-joining stablo s kojotom u korijenu iz kojeg je vidljivo da tibetski terijer pripada istoj grani kao afganistanski hrt, basenđi, lhasa apso i shih tzu, a to pak podržava rezultate Parker i sur. (2004).

Naši rezultati jasno pokazuju migracijske događaje između izvorne i zapadne populacije tibetskih terijera. Također su vidljive razmjene genetskog materijala iz terijerskog pretka u zapadnu populaciju tibetskog terijera, koje su utjecale na sam početak grane zapadnih tibetskih terijera. Uzrok tome moglo bi biti samo ime „terijer“ koje je u prošlosti pogrešno korišteno, što je moglo navesti uzgajivače tibetskih terijera da ih neometano križaju s nekim drugim terijerskim precima. Osim toga, činjenica da su tibetski terijeri smješteni bliže drugim tibetskim pasminama pasa nego drugim terijerima odgovara tome da pas danas poznat kao tibetski terijer uopće nije terijer.

Naši rezultati pokazuju i da tibetski terijer i njegove linije grade klaster koji je postavljen blizu drugih drevnih pasmina azijskog podrijetla i sivog vuka. To potvrđuje drevni karakter tibetskog terijera i njegovo pozicioniranje unutar klastera drevnih pasmina, tj. blizu događaja domestikacije. Današnja pasmina tibetski terijeri jasno je podijeljena na dvije populacije: izvornu i zapadnu populaciju tibetskih terijera. Izvorna populacija tibetskog terijera predstavlja glavni izvor gena za zapadnu populaciju tibetskih terijera koja se gotovo

100 godina odvajala od izvorne populacije kao posljedica vrlo uskog grla i genetskog odljeva. Može se pretpostaviti i doprinos terijera u zapadnu populaciju tibetskog terijera, ali je puno manje vidljiv iz dobivenih rezultata. Prema STRUCTURE analizi, tibetski terijer očito pripada drevnom azijskom klasteru koji također sadrži genski bazen sivog vuka.

Osnovnu strukturu populacije tibetskog terijera podržavaju i SNP i mikrosatelitski podaci. Središnji položaj F1 križanaca i položaj dviju generacija povratnog križanja bliže zapadnim linijama jasno pokazuju utjecaj genetskog pomaka u Lamleh liniji tibetskog terijera kao i da su neki minor aleli iz izvorne populacije tibetskog terijera zastupljeni u Lamleh liniji tibetskog terijera. Veća efektivna veličina izvorne populacije tibetskih terijera i uzgojne prakse koje podržavaju visoku razinu miješanja genetskog materijala rezultirale su razmjerno niskom razinom inbridinga u odnosu na zapadnu populaciju tibetskih terijera, koja ima mnogo višu razinu inbridinga zbog malog genskog bazena i zapadne uzgojne prakse. Te se karakteristike odražavaju i u udjelu genoma pokrivenog ROH-ovima, tj. udio genoma koji sadrži homozigotne regije puno je manji u izvornoj populaciji tibetskih terijera nego u zapadnoj populaciji. Vrlo nizak udio genoma u ROH-u izvorne populacije tibetskih terijera ukazuje na to da je genetska raznolikost izvorne populacije tibetskih terijera u odnosu na njegove zapadne srodnike veća.

Naši rezultati ukazuju na to da se razina genetske raznolikosti između izvorne populacije i zapadne populacije tibetskog terijera razlikuje. Izvorna populacija predstavlja prirodni resurs genskog bazena koji bi se mogao koristiti za smanjenje razine inbridinga u zapadnoj populaciji tibetskih terijera i predstavlja važan genetski resurs za očuvanje izvorne genetske raznolikosti i poboljšanje zapadne populacije tibetskog terijera.

5.3 Snaga mikrosatelita i mitohondrijske DNA u odnosu na SNP čipove

Rane genetske studije bile su usredotočene na sekvence mitohondrijske DNA jer su one kratke, obilne i daju relativno veliku varijabilnost. Testovi za izolaciju prema udaljenosti koji koriste podatke mtDNA sekvence postali su popularni od 2000. nadalje, kada je to postao glavni biljeg zbog brže stope mutacija i male veličine genoma u usporedbi s alozimima (Hurst i Jiggins, 2005). Od tada se koristi prilično nekritički i još uvijek nije u potpunosti razumljivo zašto se rezultati takvih istraživanja često ne podudaraju s rezultatima istraživanja nuklearnih biljega (Toews i Brelsford, 2012), iako se često kao razlog spominje manja efektivna veličina populacije što rezultira većom stopom sortiranja linija (Funk i Omland, 2003). Rezultati mtDNA analiza nesavršeno grupiraju pasmine pasa pri čemu psi nekih pasmina pripadaju u više haplotipova i haplogrupa, ali su uspješniji u razlikovanju vrsta (Savolainen i sur., 2004). Do toga dolazi zbog toga što se analizom mtDNA prate majčine linije koje potječu iz davnina. U ovom doktorskom radu primjeri naših pasmina pasa protezali su se ne samo u više haplotipova, već su neke pasmine bile zastupljene i u više haplogrupa, primjerice tornjaci koji se nalaze u haplogrupi A (haplotipovi H1, H15 i H16) i haplogrupi C (haplotip H9). Šarplaninci se nalaze u svim haplogrupama [A (haploptip H5 i H46), B (haplotip H25) i C (haplotip H41)], dok se tibetski terijeri nalaze u haplogrupi A (haplotipovi H2, H3 i H4) i haplogrupi B (haplotip H5).

No, dok se pseće pasmine nesavršeno grupiraju po mtDNA, analize mitohondrijske DNA igrale su veliku ulogu u razumijevanju drevne povijesti pasa i njihovog podrijetla od sivog vuka (Pang i sur. 2009.; Savolainen i sur. 2002). Tako se i u ovom doktorskom radu vukovi nalaze u svojim haplotipovima, odvojeni od psećih haplogrupa.

Prve studije genomskih uzoraka uključivale su mali broj pasmina i skupove markera utemeljenih na mikrosatelitima. Iz tih je studija uočeno da su različite pasmine pokazale različite frekvencije alela (Irion i sur. 2003; Koskinen 2003). Zbog malog broja pasmina, moglo bi se prikupiti malo podataka o njihovim odnosima, ali pokazali su da svaka pojedina pasmina pokazuje svoj jedinstveni uzorak markerskih alela i podržavaju hipotezu da je unutar pasmine mnogo manje varijacija nego kod različitih vrsta. Godine 2004. objavljena je studija koja je ispitala odnose između 85 različitih pasmina pomoću skupa podataka od 96 mikrosatelitskih markera (Parker i sur. 2004), čiji rezultati su pokazali gotovo nepogrešivo svrstavanje pasa u svoje pasmine. Mikrosatelitski markeri odabrani su iz svih autosoma psa. U našem radu korišten je set od 18 mikrosatelitnih lokusa predložen od strane ISAG-a. S obzirom na mali broj lokusa naši su rezultati pokazivali jasno odjeljivanje genetskih populacija. Kod tornjaka genetske populacije podijelile su naše uzorke na

hrvatske i bosanskohercegovačke, dok su tibetske terijere podijelili u zapadnu i nativnu populaciju iste pasmine. Pregledni rad (Toews i Brelsford, 2012) zaključuje da radovi koji su analizirali i mtDNA i mikrosatelite obično dobivaju oprečne rezultate, pri čemu mikrosateliti imaju veću vjerojatnost da identificiraju IBD od mtDNA jer je mtDNA samo pola genetske slike.

Od objavljivanja cjelokupnog slijeda genoma psa (Lindblad-Toh i sur. 2005) mnoga su istraživanja dala prednost SNP-ovima pred mikrosatelitima zbog lakše genotipizacije bialelnih markera i sposobnosti da se u samo jednoj reakciji genotipizira više tisuća markera. Primarna je razlika između filogenetske analize temeljene na SNP-ovima i analize klastera zasnovane na mikrosatelitima ta što klasteriranje zasnovano na mikrosatelitima pokazuje hibridizaciju između grupa, dok filogenetsko stablo SNP čipa pokazuje jedinstveno postavljanje svake pasmine u svoju skupinu. Na primjer, pekinezer i shih tzu grupiraju se s patuljastim psima na filogenetskom stablu SNP čipa kao moderne pasmine, ali u klaster-analizi su 30 % drevne kao što bi se moglo i očekivati na temelju njihovog azijskog podrijetla (Parker i sur., 2007). Slično tome, po klaster-analizi mikrosatelita krvosljednik pokazuje neočekivanu mješavinu planinskih i modernih pasmina, dok se na filogenetskom stablu smješta među druge lovačke pasmine kao moderna pasmina pasa. Stoga je za postizanje najtočnijeg uvida u razvoj pasmine i trenutne odnose važno uzeti u obzir obje analize. Moć razlučivosti biljega ovisi o broju i frekvenciji alela i lokusa dostupnih za svaku populaciju. Mikrosateliti mogu obično nositi nekoliko puta veći broj alela od SNP-ova, ali obilje SNP lokusa stvara neizbježnu prednost u snazi rezolucije, posebno u slučajevima kada mikrosateliti možda ne funkcioniraju optimalno zbog velike povezanosti unutar populacije ili uskog grla populacije. U našem radu analizom SNP čipa kraški ovčari, šarplaninci i tornjaci postavili su se jasno u svoje pasmine, ali filogenetskom analizom i među ostale pastirske pse. Kod tibetskih terijera naši psi podijelili su se u zapadnu i izvornu populaciju: i dok su se europski postavili bliže ostalim patuljastim tibetskim psima kao shih tzu, izvorni su se postavili bliže primitivnim psima kao što je haski. Pri STRUCTURE analizi pasmine su jasno odjeljene, a u nekim pasminama su se jasno vidjela i križanja, npr. F1 generacija križanaca izvornih tibetskih terijera s Lamleh linijom zapadne populacije tibetskog terijera.

U našim radovima pokazalo se korisno imati uključene sve biljege. MtDNA pružala nam je jasniju sliku majčinskih linija, mikrosateliti su nam pokazali unutarpasminsku strukturu, a SNP čipovi su nam pokazali točnije međupasminske odnose. Ujedno, genotipiziranjem mikrosatelita dobili smo rezultate sukladne onima dobivenim genotipiziranjem pomoću SNP čipa, dok smo SNP čipove mogli usporediti s mnogo drugih uzoraka različitih pasmina pasa zbog njihove dostupnosti u javnim bazama podataka.

5.4 Pretpostavke i ograničenja istraživanja

5.4.1 Vjerodostojnost literaturnih navoda

Informacije o pasminama pasa korištene u ovom doktorskom radu citirane su iz izvora pisanih na hrvatskom, slovenskom, srpskom i engleskom jeziku, a odobrene su od strane Hrvatskog kinološkog saveza, Kinološke zveze Slovenije i Srpskog kinološkog saveza, koji pak djeluju pod krovnom institucijom Fédération Cynologique Internationale. To ne bi bio problem da se oko nekih pasmina, kao na primjer pasmine tibetski terijer, i dalje ne vode rasprave oko priznavanja matične zemlje i točnog tumačenja povijesti pasmine između međunarodnih kinoloških saveza (FCI i The Kennel Club).

5.4.2 Uzorkovanje

Ograničenje s kojim smo se susreli radeći ovaj rad je dostupnost materijala. Psi su najčešće u privatnom vlasništvu, a vlasnici često nisu skloni dijeljenju podataka o svojim ljubimcima. Nadalje, vlasnici koji su bili skloni suradnji radije su birali dati uzorak dlake nego uzorak krvi za daljnja istraživanja.

5.4.3 Homoplazija mikrosatelita

Problem s mikrosatelitima uglavnom se svodi na to može li se pouzdano zaključiti relativan broj ponavljanja između pojedinih uzoraka. Problem nastaje kada mutacija u bočnom području uzrokuje promjenu ukupne duljine fragmenta. Ako se razmatra samo dužina fragmenta, takva mutacija može oponašati adiciju (ili deleciju) ponavljanja, što dovodi do pogrešnih zaključaka. Ta se pojava naziva homoplazija – sličnost u duljini fragmenta ne pojavljuje se zbog njihovog zajedničkog pretka, već zbog nevidljivih promjena na području koja se susjedno ponavljaju. Homoplazija je posljedica popularnosti visoko varijabilnih stepenasto mutirajućih markera, poput mikrosatelita. Mikrosatelitni aleli općenito se odnose na fragmente DNA različitih veličina. Identični su po stanju (tj. veličinom su identični), ali nisu nužno identični po pretku zbog konvergentnih mutacija. Homoplazija koja se događa u mikrosatelitima naziva se homoplazijom veličine. Situacije u kojima homoplazija veličine može biti problematičnija uključuju visoke mutacije i velike veličine populacije, zajedno s jakim ograničenjima veličine alela.

5.4.4 Pristranost CanineHD Genotyping BeadChipa

Znanstvenici s Broad Institutea (Harvard, SAD) 2005. godine objavili su trenutni skup psećeg genoma CanFam2.0. Projekt sekvenciranja psećeg genoma proizveo je visokokvalitetan nacrt genoma bokserice po imenu Tasha. Tashin genom korišten je kao

sekvenca za usporedbu podataka s drugim ključnim pasminama pasa (Lindblad-Toh i sur., 2005). Iz tih usporedbi identificirano je preko 2,5 milijuna visokokvalitetnih SNP-ova.

CanineHD Genotyping BeadChip sadrži više od 170 000 biljega postavljenih na referentnu sekvencu CanFam2.0. Illumina je razvila BeadChip u suradnji s konzorcijem LUPA koji uključuje 22 europska sveučilišta i druge partnere, poput Broad Institutea. CanineHD BeadChip omogućava ispitivanje genetske varijacije u bilo kojoj pasmini pasa svojim visokim polimorfnim SNP sadržajem i pružanjem ujednačene genomske pokrivenosti. Pseći BeadChip predstavlja prosjek s više od 70 biljega po megabazi (Mb), pružajući dovoljnu gustoću SNP-ova za robusna populacijska međupasminska istraživanja kao i istraživanja o varijacijama broja kopija (CNV). Pored toga, haplotipovi među pasminama pasa kreću se u rasponu od 10 do 100 kb, sugerirajući da se genetski faktori rizika vjerojatno dijele među pasminama. Gusti set biljega CanineHD povećava sposobnost otkrivanja signala za svojstva koja se dijele među pasminama i za faktore rizika.

Sadržaj SNP-ova na CanineHD BeadChipu izabran je iz seta od 2,5 milijuna SNP-ova iz projekta "Dog Genome". Pored toga, identificirano je 1696 SNP-ova koristeći metodu ciljanog resekvenciranja na temelju hibridizacije, koja pronalazi SNP-ove unutar praznina u SNP mapi. SNP-ovi su odabrani tako da predstavljaju što je moguće više različitih pasmina, a da pritom održavaju pokrivenost od otprilike 70 SNP-ova po 1 Mb.

Do korištenja psa pasmine bokser kao referentnog psa za CanineHD BeadChip došlo je zbog dostupnosti materijala te je kasnije uspoređivan s drugim pasminama pasa. Iako je bokser kao i svaka druga pasmina, samo „varijacija na temu“, ipak tu činjenicu moramo imati na umu cijelo vrijeme. U našim rezultatima primijetila se pristranost te znatan pomak i odvajanje pasmine bokser u odnosu na druge pasmine. Primjerice, na neighbor-joining stablu pri proučavanju tibetskih terijera i njihovog odnosa s drugim pasminama pasa unutarnje grane koje dovode do populacije boksera i sivog vuka duže su od onih koje vode drugim pasminama. I dok je grana vuka lako objašnjiva, budući da se radi o drugoj vrsti životinje, duga grana boksera može se objasniti činjenicom da je velik udio SNP-ova na Canine HD nizu odabran usporedbom boksera s drugim pasminama, što implicira da je skup podataka obogaćen za SNP-ove koji omogućuju razlikovanje boksera od ostalih pasmina.

5.4.5 Financije

Zbog maksimalne iskoristivosti ograničenih financijskih sredstava za ovaj doktorski rad odlučili smo se na gentopizaciju SNP čipa samo manjeg broja pasa od ukupnog skupa

uzoraka svih spomenutih pasmina pasa. Rezultati bi bili još relevantniji genotipizacijom svih uzoraka koje smo sakupili i time bi zaključci bili još snažniji.

5.5 Znanstveni doprinos i daljnji izazov

Znanstveni doprinos ovog istraživanja bolji je uvid u odnose među promatranim pasminama pasa i njihov doprinos ukupnoj genetičkoj raznolikosti pomoću informacija iz rodovnica, mikrosatelitnih biljega, mitohondrijske DNA i SNP biljega. Svaki od korištenih biljega imao je svoje prednosti, ali i mane koje smo ispitali na svojim uzorcima. Koristeći mtDNA dobili smo rezultate o majčinih linijama kraškog ovčara, šarplaninca, tornjaka i tibetskog terijera, analizirali smo raznolikost više pasmina pasa u širem smislu i odredili smo haplotipove. Za bolje uvide u interpasminsku strukturu svih tornjaka i tibetskog terijera koristili smo mikrosatelite, dok smo ih s drugim pasminama najuspješnije usporedili koristeći SNP čipove. Pokušali smo rekonstruirati povijesne genetičke događaje i odgovoriti na pitanje kojim je smjerom išla migracija genetičkog materijala među promatranim pasminama.

Daljnji izazov koji bi slijedio ovaj doktorski rad bio bi koncentriran na sakupljanje dodatnih uzoraka svih spomenutih pasmina, ali i pasmina koje su se u ovom radu pokazale genetički bliskima, no preuzete su iz javno dostupnih baza. U budućnosti bilo bi korisno imati kompletirane pedigree koji sadrže i neke fenotipske podatke svih pasa koji se uzorkuju kako bi metode obrade podataka bile još raznovrsnije, a rezultati i zaključci još točniji. Jedan od dodatnih izazova je i primijeniti ovaj rad na ostale hrvatske autohtone pasmine pasa.

No, dugoročni cilj globalne genomike pasa je kompleksan. Određene studije idu u smjeru određivanja alela koji su odgovorni za stvaranje određenih pasmina pasa. Time se želi razjasniti primjerice koji aleli kontroliraju određena „urođena“ ponašanja pasa ili pak koji aleli upravljaju drugačijim fenotipovima (poput oblika ušiju ili lubanje). Uloženi su znatni naponi u mapiranje genotipa i fenotipa pasa kojima bi se trebale pripisati određene fizičke osobine ili pak potencijalni nasljedni poremećaji svakog psa bilo koje pasmine (Parker et al, 2017). Krajnji je cilj pokušati eliminirati što više štetnih alela iz različitih pasmina kako bi buduće generacije pasa imale što manje specifičnih genetskih poremećaja. Kao svojevrsna dodana vrijednost, tehnike i metode koje se koriste za mapiranje određenih gena u psećem genomu primijenjuju se i na mapiranje gena koji uzrokuju bolesti u ljudskom genomu (Sutter i Ostrander, 2004). Na taj način životinja koju smo prvu domesticirali i dalje nam pomaže u savladavanju izazova u životu.

Iako direktnog projekta na populacijskoj genetici pasa nije bilo, ovaj rad ostvaren je i financiran pomoću sljedećih potpora, stipendija i projekata: potpore Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske “Projekt bilateralne suradnje između Hrvatske i Slovenije (BI-HR / 14-15-033)”, projekta Hrvatske zaklade za znanost “Primjena NGS metoda u procjeni genomske varijabilnosti preživača – ANAGRAMS (IP-2018-01-8708)”, potpore

istraživanja Javne agencije za znanstvenu djelatnost Republike Slovenije (ARRS) (P4-0220), CEEPUS Network stipendije (CIII-SK-0044-09-1415), CEEPUS III FREEMOVER stipendije za mobilnost (1516-89203) i potpore ERASMUS + Mobilnost studenata (2016/17 - KA103).

6 ZAKLJUČCI

Populacijska genetika grana je genetike koja se bavi proučavanjem genetičke strukture populacije, odnosno analizom učestalosti gena i genotipova u prirodnim populacijama, kao i čimbenicima koji ih određuju. Brojne studije u posljednja dva desetljeća koristile su različite tipove genetskih biljega kako bi procijenile genetske varijacije, heterozigotnost i filogenetske odnose između pasmina pasa (Plassais i sur., 2019). Osim na autosomalnu genomsku regiju, istraživanja su također bila usmjerena na kromosom Y (Ding i sur., 2011) i mitohondrijsku DNA (mtDNA) (Pang et al. 2009).

U ovom radu procijenili smo genetske strukture populacija velikih pastirskih pasa s Balkana (tornjaka, kraškog ovčara i šarplaninca). Putem mtDNA, mikrosatelita i SNP čipa procijenili smo genetske strukture tih populacija, a rezultati nam pokazuju da sve te populacije predstavljaju jasno genetski diferencirane populacije.

Procijenili smo inbriding i efektivnu veličinu populacija balkanskih pastirskih pasmina pasa na temelju ROH analize i usporedbom s ostalim pasminama pasa iz LGD grupe zaključili da imaju inbriding sličan kao druge pasmine LGD grupe, osim kraškog ovčara koji ima nešto viši inbriding. Generalno, sve pasmine pasa iz LGD grupe imaju niži inbriding od drugih promatranih modernih pasmina pasa, kao što je haski ili labrador retriever. Efektivna veličina također se ne razlikuje puno od efektivne veličine drugih LGD-ova, ali je viša od efektivne veličine drugih modernih pasmina pasa.

Genetsku strukturu tibetskih terijera zapadnih linija te izvorne linije tibetskih terijera procijenili smo putem mtDNA, mikrosatelita i SNP čipa radi jasne genetske diferencijacije pasmina, ali i linija ove pasmine. Rezultati tih procjena govore nam da zapadne linije tibetskih terijera doista obuhvaćaju samo manji dio genetskog bazena izvornih azijskih tibetskih terijera. Tibetski terijeri predstavljaju genetsku populaciju, ali zapadna i izvorna populacija te pasmine se jasno genetsko diferencira. Također, obje genetske populacije tibetskog terijera genetički su sličnije i bliže drugim patuljastim azijskim pasminama pasa nego terijerima.

Procijenili smo koeficijent inbridinga tibetskih terijera na temelju ROH analiza. Usporedba procijenjenih koeficijenata inbridinga u izvornoj populaciji tibetskog terijera s nekim drugim populacijama pasmina otkrila je vrlo nizak koeficijent inbridinga. Izvornu populaciju tibetskog terijera karakterizira nizak stupanj dugog ROH-a, dok zapadna populacija ima znatno viši stupanj dugog ROH-a, ali i ukupan udio genoma obuhvaćenog ROH-om. Na temelju ove analize izvorna populacija tibetskog terijera pripada populaciji

pasa s najnižim stupnjem inbridinga, što povećava vrijednost populacije kao genetskog resursa. Niska razina inbridinga izvornih tibetskih terijera čija uzgojna praksa podržava miješanje rezultat je veće efektivne veličine populacije u usporedbi sa zapadnom populacijom tibetskih terijera u kojoj postoji znatno viša razina inbridinga zbog malog genetskog bazena i stroge uzgojne prakse koja podržava linijska parenja.

7 POPIS LITERATURE

- Ballou J. D. (1983). Calculating inbreeding coefficients from pedigrees. *Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations*, Benjamin/Cummings, Menlo Park, SAD, str. 509-520
- Bandelt H. J., Forster P., Rohlf A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16 (1): 37-48. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Berglund J., Nevalainen E. M., Molin A. M., Perloski M., André C., Zody M. C., Sharpe T., Hitte C., Lindblad-Toh K., Lohi H., Webster M. T., The L. C. (2012). Novel origins of copy number variation in the dog genome. *Genome Biol.* 13 (8): R73
- Bigi D., Marelli S. P., Randi E., Polli M. (2015). Genetic characterization of four native Italian shepherd dog breeds and analysis of their relationship to cosmopolitan dog breeds using microsatellite markers. *Animal* 9 (12): 1921-1928. doi: 10.1017/S1751731115001561
- Boyko A. R., Boyko R. H., Boyko C. M., Parker H. G., Castelhamo M., Corey L., Degenhardt J. D., Auton A., Hedimbi M., Kityo R., Ostrander E. A., Schoenebeck J., Todhunter R. J., Jones P., Bustamante C. D. (2009). Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (33): 13903-13908. doi: 10.1073/pnas.0902129106
- Boyko A. R., Quignon P., Li L., Schoenebeck J. J., Degenhardt J. D., Lohmueller K. E., Zhao K., Brisbin A., Parker H. G., vonHoldt B. M., Cargill M., Auton A., Reynolds A., Elkahouloun A. G., Castelhamo M., Mosher D. S., Sutter N. B., Johnson G. S., Novembre J., Hubisz M. J., Siepel A., Wayne R. K., Bustamante C. D., Ostrander E. A. (2010). A Simple Genetic Architecture Underlies Morphological Variation in Dogs. *PLoS Biology* 8 (8): 1-13
- Brajkovic V., Duvnjak I., Ferencakovic M., Špehar M., Nikola R., Lukic B., Curik I., Cubric Curik V. (2018). The effect of DNA quality on the sequencing success of cattle. *J. Cent. Eur. Agric.* 19: 804-809. doi: 10.5513/JCEA01/19.4.2340
- Broman K. W., Weber J. L. (1999). Long homozygous chromosomal segments in reference families from the centre d'étude du polymorphisme humain. *Am. J. Hum. Genet.* 65 : 1493–1500. doi: 10.1086/302661
- Carracedo A., Bar W., Lincoln P., Mayr W., Morling N., Olaisen B., Schneider P., Budowle B., Brinkmann B., Gill P., Holland M., Tully G., Wilson M. (2000). DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci. Int.* 110 (2): 79-85. doi: 10.1016/s0379-0738(00)00161-4

- Ceh E., Dovc P. (2014). Population structure and genetic differentiation of livestock guard dog breeds from the Western Balkans. *J. Anim. Breed. Genet.* 131 (4): 313-325. doi: 10.1111/jbg.12077
- Chen W. C. (2011). Overlapping codon model, phylogenetic clustering, and alternative partial expectation conditional maximization algorithm. Iowa State University, Iowa, SAD, str. 10-11
- Choi B. H., Wijayananda H. I., Lee S. H., Lee D. H., Kim J. S., Oh S. I., Park E. W., Lee C. K., Lee S.H. (2017). Genome-wide analysis of the diversity and ancestry of Korean dogs. *PLOS ONE* 12 (11): 1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0188676
- Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 44 (D1): D67-72. doi: 10.1093/nar/gkv1276
- Crnokrak P., Barrett S. C. (2002). Perspective: purging the genetic load: a review of the experimental evidence. *Evolution* 56 (12): 2347-2358. doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00160.x.
- Cunliffe J., Johnson C. A., Peters P. (2006). Tibetan Terrier. *Comprehensive Owner's Guide.* Kennel Club Books, SAD, str. 12-15
- Desmyter S., Gijbbers L. (2012). Belgian canine population and purebred study for forensics by improved mitochondrial DNA sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (1): 113-120. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.03.011
- Ding Z.L., Oskarsson M., Ardalán A., Angleby H., Dahlgren L. G., Tepeli C., Kirkness E., Savolainen P., Zhang Y. P. (2011). Origins of domestic dog in Southern East Asia is supported by analysis of Y-chromosome DNA. *Heredity* 108: 507-514. doi: 10.1038/hdy.2011.114
- Društvo ljubiteljev in vzrediteljev kraških ovčarjev Slovenije. DLVKOS. Izvor: <https://rodica.bf.uni-lj.si/app/f?p=103:3:17281343445616> [Pristupljeno 6.7.2019.]
- Falconer D. S. (1989). *Introduction to quantitative genetics.* Longman, Scientific & Technical ; Wiley, Burnt Mill, Harlow, Essex, England; New York, SAD, str.58-62
- Falconer D. S., Mackay T. F. C. (1996). *Introduction to quantitative genetics.* Longman, Essex, Velika Britanija
- Fédération Cynologique Internationale. FCI. (2019). Breeds, kraški ovčar, Izvor: <http://www.fci.be/en/nomenclature/KARST-SHEPHERD-DOG-278.html> [Pristupljeno 4.5.2019.]
- Fédération Cynologique Internationale. FCI. (2019). Breeds, šarplaninac. Izvor: <http://www.fci.be/en/nomenclature/YUGOSLAVIAN-SHEPHERD-DOG-SHARPLANINA-41.html> [Pristupljeno 4.5.2019.]

- Fédération Cynologique Internationale. FCI. (2019). Breeds, Tibetan terrier. Izvor: <http://www.fci.be/en/nomenclature/TIBETAN-TERRIER-209.html> [Pristupljeno 4.5.2019.]
- Fédération Cynologique Internationale. FCI. (2019). Breeds, tornjak. Izvor: <http://www.fci.be/en/nomenclature/BOSNIAN-AND-HERZEGOVINIAN-CROATIAN-SHEPHERD-DOG-355.html> [Pristupljeno 4.5.2019.]
- Fédération Cynologique Internationale. FCI. (2019). The FCI, Presentation of our organisation. Izvor: <http://www.fci.be/en/Presentation-of-our-organisation-4.html> [Pristupljeno 4.5.2019.]
- Ferenčaković M., Sölkner J., Curik I. (2013). Estimating autozygosity from high-throughput information: effects of SNP density and genotyping errors. *Genet. Sel. Evol.* 45 (1): 1-9
- Fogle B., (2007) *The New Encyclopedia of the Dog*, 2. izdanje. Prentice Hall PTR, SAD, str. 40-210
- Fridez F., Rochat S., Coquoz R. (1999). Individual identification of cats and dogs using mitochondrial DNA tandem repeats? *Sci. Justice* 39 (3): 167-171. doi: 10.1016/S1355-0306(99)72042-3
- Funk D. J., Omland K. E. (2003). Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34 (1): 397-423. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421
- Greenberg B. D., Newbold J. E., Sugino A. (1983). Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene* 21 (1-2): 33-49. doi: 10.1016/0378-1119(83)90145-2
- Gulisija D., Crow J. F. (2007). Inferring purging from pedigree data. *Evolution* 61 (5): 1043-1051. doi: 10.1111/j.1558-5646.2007.00088.x
- Gundry R. L., Allard M. W., Moretti T. R., Honeycutt R. L., Wilson M. R., Monson K. L., Foran D. R. (2007). Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Dog: Control Region Variation Within and Among Breeds. *J. Forensic Sci.* 52 (3): 562-572. doi: 10.1111/j.1556-4029.2007.00425.x
- Gunter L. M., Barber R. T., Wynne C. D. L. (2018). A canine identity crisis: Genetic breed heritage testing of shelter dogs. *PLoS One* 13 (8): 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0202633
- Howrigan D. P., Simonson M. A., Keller M. C. (2011). Detecting autozygosity through runs of homozygosity: a comparison of three autozygosity detection algorithms. *BMC Genom.* 12 (460): 1-15. doi: 10.1186/1471-2164-12-460
- Hrvatski kinološki savez. HKS. (2019). Autohtone pasmine, tornjak. Izvor: <https://web.hks.hr/tornjak/> [Pristupljeno 14.5.2019.]

- Hrvatski kinološki savez. HKS. (2019). O HKSu, O nama. Izvor: <https://web.hks.hr/o-nama/> [Pristupljeno 14.5.2019.]
- Hurst G. D., Jiggins F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc. Biol. Sciences* 272 (1572): 1525-1534. doi: 10.1098/rspb.2005.3056
- Huson D. H., Bryant D. (2005). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* 23 (2): 254-267. doi: 10.1093/molbev/msj030
- Imes D. L., Wictum E. J., Allard M. W., Sacks B. N. (2012). Identification of single nucleotide polymorphisms within the mtDNA genome of the domestic dog to discriminate individuals with common HVI haplotypes. *Genetics* 6 (5): 630-639. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.02.004
- Irion D. N., Schaffer A. L., Famula T. R., Eggleston M. L., Hughes S. S., Pedersen N. C. (2003). Analysis of genetic variation in 28 dog breed populations with 100 microsatellite markers. *J Hered.* 94 (1): 81-87. doi: 10.1093/jhered/esg004
- Jombard T., Devillard S., Balloux F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 11 (94): 1-15. doi: 10.1186/1471-2156-11-94
- Kim K. S., Lee S. E., Jeong H. W., Ha J. H. (1998). The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol. Phylogenetics Evol.* 10 (2): 210-220
- Kinološka Zveza Slovenije. KZS. (2019). Kraški ovčar. Izvor: <http://www.kinoloska.si/kraski-ovcar/> [Pristupljeno 6.7.2019.]
- Kinološka Zveza Slovenije. KZS. (2019). KZS. Izvor: <http://www.kinoloska.si/kzs/> [Pristupljeno 6.7.2019.]
- Kinološki savez Republike Srpske. KSRS. (2019). Naše rase, šarplaninac. Izvor: <https://kinoloskisavezksrs.com/sarplaninac/> [Pristupljeno 18.9.2019.]
- Kinološki savez Republike Srpske. KSRS. (2019). O nama, Istorijat Saveza. Izvor: <https://kinoloskisavezksrs.com/istorijat-saveza/> [Pristupljeno 18.9.2019.]
- Kondo R., Satta Y., Matsuura E. T., Ishiwa H., Takahata N., Chigusa S. I. (1990). Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* 126 (3): 657-663
- 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. *Mol. Ecol. Resour.* 15 (5): 1179-1191. doi: 10.1111/1755-0998.12387

- Koskinen M. T. (2003). Individual assignment using microsatellite DNA reveals unambiguous breed identification in the domestic dog. *Anim. Genet.* 34 (4): 297-301. doi: 10.1046/j.1365-2052.2003.01005.x
- Kropatsch R., Streitberger K., Schulte-Middelmann T., Dekomien G., Epplen J. T. (2011). On ancestors of dog breeds with focus on Weimaraner hunting dogs. *J. Anim. Breed. Genet.* 128 (1): 64-72. doi: 10.1111/j.1439-0388.2010.00874.x
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33 (7): 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Larson G., Karlsson E. K., Perri A., Webster M. T., Ho S. Y., Peters J., Stahl P.W., Piper P. J., Lingaas F., Fredholm M., Comstock K. E., Modiano J. F., Schelling C., Agoulnik A. I., Leegwater P. A., Dobney K., Vigne J. D., Vila C., Andersson L., Lindblad-Toh K. (2012). Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 109 (23): 8878-8883. doi: 10.1073/pnas.1203005109
- Leigh J. W., Bryant D. (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol.Evol.* 6 (9): 1110-1116. doi: 10.1111/2041-210X.12410
- Leroy G., Verrier E., Meriaux J. C., Rognon X. (2009). Genetic diversity of dog breeds: within-breed diversity comparing genealogical and molecular data. *Animal Genet.* 40 (3): 323-332. doi: 10.1111/j.1365-2052.2008.01842.x
- Librado P., Rozas J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 (11): 1451-1452. doi: 10.1093/bioinformatics/btp187
- Linacre A., Tobe S. S. (2011). An overview to the investigative approach to species testing in wildlife forensic science. *Investig. Genet.* 2 (1): 1-9. doi: 10.1186/2041-2223-2-2
- Lindblad-Toh K., Wade C. M., Mikkelsen T. S., Karlsson E. K., Jaffe D. B., Kamal M., Clamp M., Chang J. L., Kulbokas E. J., Zody M. C., Mauceli E., Xie X., Breen M., Wayne R. K., Ostrander E. A., Ponting C. P., Galibert F., Smith D. R., deJong P. J., Kirkness E., Alvarez P., Biagi T., Brockman W., Butler J., Chin C. W., Cook A., Cuff J., Daly M. J., DeCaprio D., Gnerre S., Grabherr M., Kellis M., Kleber M., Bardeleben C., Goodstadt L., Heger A., Hitte C., Kim L., Koepfli K. P., Parker H. G., Pollinger J. P., Searle S.M.J., Sutter N.B., Thomas R., Webber C., Baldwin J., Abebe A., Abouelleil A., Aftuck L., Ait-zahra M., Aldredge T., Allen N., An P., Anderson S., Antoine C., Arachchi H., Aslam A., Ayotte L., Bachantsang P., Barry A., Bayul T., Benamara M., Berlin A., Bessette D., Blitshteyn B., Bloom T., Blye J., Boguslavskiy L., Bonnet C., Boukhgalter B., Brown A., Cahill P., Calixte N., Camarata J., Cheshatsang Y., Chu J., Citroen M., Collymore A., Cooke P., Dawoe T., Daza R., Decktor K., DeGray S., Dhargay N., Dooley K.,

Dooley K., Dorje P., Dorjee K., Dorris L., Duffey N., Dupes A., Egbiremolen O., Elong R., Falk J., Farina A., Faro S., Ferguson D., Ferreira P., Fisher S., FitzGerald M., Foley K., Foley C., Franke A., Friedrich D., Gage D., Garber M., Gearin G., Giannoukos G., Goode T., Goyette A., Graham J., Grandbois E., Gyaltzen K., Hafez N., Hagopian D., Hagos B., Hall J., Healy C., Hegarty R., Honan T., Horn A., Houde N., Hughes L., Hunnicutt L., Husby M., Jester B., Jones C., Kamat A., Kanga B., Kells C., Khazanovich D., Kieu A.C., Kisner P., Kumar M., Lance K., Landers T., Lara M., Lee W., Leger J.-P., Lennon N., Leuper L., LeVine S., Liu J., Liu X., Lokyitsang Y., Lokyitsang T., Lui A., Macdonald J., Major J., Marabella R., Maru K., Matthews C., McDonough S., Mehta T., Meldrim J., Melnikov A., Meneus L., Mihalev A., Mihova T., Miller K., Mittelman R., Mlenga V., Mulrain L., Munson G., Navidi A., Naylor J., Nguyen T., Nguyen N., Nguyen C., Nguyen T., Nicol R., Norbu N., Norbu C., Novod N., Nyima T., Olandt P., O'Neill B., O'Neill K., Osman S., Oyono L., Patti C., Perrin D., Phunkhang P., Pierre F., Priest M., Rachupka A., Raghuraman S., Rameau R., Ray V., Raymond C., Rege F., Rise C., Rogers J., Rogov P., Sahalie J., Settipalli S., Sharpe T., Shea T., Sheehan M., Sherpa N., Shi J., Shih D., Sloan J., Smith C., Sparrow T., Stalker J., Stange-Thomann N., Stavropoulos S., Stone C., Stone S., Sykes S., Tchuinga P., Tenzing P., Tesfaye S., Thoulutsang D., Thoulutsang Y., Topham K., Topping I., Tsamla T., Vassiliev H., Venkataraman V., Vo A., Wangchuk T., Wangdi T., Weiland M., Wilkinson J., Wilson A., Yadav S., Yang S., Yang X., Young G., Yu Q., Zainoun J., Zembek L., Zimmer A., Lander E.S., Broad Sequencing Platform m (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438 (7069): 803-819. 10.1038/nature04338

Linnell J. D. C., Lescureux N. (2015). Livestock guarding dogs. Cultural heritage icons with a new relevance for mitigating conservation conflicts. Norwegian Institute for Nature Research, Trondheim, Norveška, str. 23-28

Mathiasen H. (2006). Tibetan terriers: the little people. Hanne Mathiasen, Odense, Danska, str. 104-109

McQuillan R., Leutenegger A. L., Abdel-Rahman R., Franklin C. S., Pericic M., Barac-Lauc L., Smolej-Narancic N., Janicijevic B., Polasek O., Tenesa A., Macleod A. K., Farrington S. M., Rudan P., Hayward C., Vitart V., Rudan I., Wild S. H., Dunlop M. G., Wright A. F., Campbell H., Wilson J.F. (2008). Runs of homozygosity in European populations. *Am. J. Hum. Genet.* 83 (3): 359-372. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.08.007

Nakić-Petrina Lj. (2002). Hrvatski planinski pas tornjak. Tornjak klub, Šibenik, Hrvatska, str. 111-123.

Olafsdóttir G., Kristjánsson T. (2008). Correlated pedigree and molecular estimates of inbreeding and their ability to detect inbreeding depression in the Icelandic sheepdog, a recently bottlenecked population of domestic dogs. *Conserv. Genet.* 9: 1639-1641. doi: 10.1007/s10592-008-9526-0.

- Ostrander E. (2007). Genetics and the Shape of Dogs. *Amer. Sci.* 95 (5): str. 406-413
- Pang J. F., Kluetsch C., Zou X. J., Zhang A.B., Luo L.Y., Angleby H., Ardalan A., Ekstrom C., Skollermo A., Lundeberg J., Matsumura S., Leitner T., Zhang Y. P., Savolainen P. (2009). mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Mol. Biol. Evol.* 26 (12): 2849-2864. doi: 10.1093/molbev/msp195
- Paradis E., Schliep K. (2019). Ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35 (3): 526-528. doi: 10.1093/bioinformatics/bty633
- Parker H. G., Dreger D. L., Rimbault M., Davis B. W., Mullen A. B., Carpintero-Ramirez G., Ostrander E. A. (2017). Genomic Analyses Reveal the Influence of Geographic Origin, Migration, and Hybridization on Modern Dog Breed Development. *Cell Rep.* 19 (4): 697-708. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.079
- Parker H. G., Kim L. V., Sutter N. B., Carlson S., Lorentzen T. D., Malek T. B., Johnson G. S., DeFrance H. B., Ostrander E. A., Kruglyak L. (2004). Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog. *Science* 304 (5674): 1160-1164. doi: 10.1126/science.1097406
- Parker H. G., Kukekova A. V., Akey D. T., Goldstein O., Kirkness E. F., Baysac K. C., Mosher D. S., Aguirre G. D., Acland G. M., Ostrander E. A. (2007). Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Res.* 17 (11): 1562-1571 . doi: 10.1101/gr.6772807
- Parra D., Méndez S., Cañón J., Dunner S. (2008). Genetic differentiation in pointing dog breeds inferred from microsatellites and mitochondrial DNA sequence. *Anim. Genet.* 39 (1): 1-7. doi: 10.1111/j.1365-2052.2007.01658.x
- Pedersen N., Liu H., Theilen G., Sacks B. (2013). The effects of dog breed development on genetic diversity and the relative influences of performance and conformation breeding. *J. Anim. Breed. Genet.* 130 (3): 236-248. doi: 10.1111/jbg.12017
- Peng M. S., Fan L., Shi N. N., Ning T., Yao Y. G., Murphy R. W., Wang W. Z., Zhang Y. P. (2015). DomeTree: a canonical toolkit for mitochondrial DNA analyses in domesticated animals. *Mol. Ecol. Resour.* 15 (5): 1238-1242. doi: 10.1111/1755-0998.12386
- Pereira F., Carneiro J., Van Asch B. (2010). A guide for mitochondrial DNA analysis in non-human forensic investigations. *Forensic Sci. Int. Journal* 3 (1): 33-44. doi: 10.2174/1874402801003020033
- Pickrell J. K., Pritchard J. K. (2012). Inference of Population Splits and Mixtures from Genome-Wide Allele Frequency Data. *PLOS Genetics* 8 (11): 1-17. doi: 10.1371/journal.pgen.1002967

- Pirchner F. (1985). Genetic structure of population. 1. Closed populations or matings among related individuals. In: General and quantitative genetics. Chapman, A. B., ed. World Animal Science A4. Elsevier, Amsterdam, Nizozemska
- Pires A. E., Amorim I. R., Ginja C., Gomes M., Godinho I., Simões F., Oom M., Petrucci-Fonseca F., Matos J., Bruford M. W. (2009). Molecular structure in peripheral dog breeds: Portuguese native breeds as a case study. *Anim. Genet.* 40 (4): 383-392. doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01849.x
- Pires A. E., Ouragh L., Kalboussi M., Matos J., Petrucci-Fonseca F., Bruford M. W. (2006). Mitochondrial DNA sequence variation in Portuguese native dog breeds: diversity and phylogenetic affinities. *J. Hered.* 97 (4): 318-330. 10.1093/jhered/esl006
- Plassais J., Kim J., Davis B. W., Karyadi D. M., Hogan A. N., Harris A. C., Decker B., Parker H. G., Ostrander E. A. (2019). Whole genome sequencing of canids reveals genomic regions under selection and variants influencing morphology. *Nat. Commun.* 10 (1): 1489-1489. doi: 10.1038/s41467-019-09373-w
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2): 945-959
- Sams A. J., Boyko A. R. (2019). Fine-Scale Resolution of Runs of Homozygosity Reveal Patterns of Inbreeding and Substantial Overlap with Recessive Disease Genotypes in Domestic Dogs. *G3* 9 (1): 117-123. doi: 10.1534/g3.118.200836
- Savolainen P., Zhang Y. P., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. (2002). Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science* 298 (5598): 1610-1613. doi: 10.1126/science.1073906
- Scharnhorst G., Kanthaswamy S. (2011). An assessment of scientific and technical aspects of closed investigations of canine forensics DNA - case series from the University of California, Davis, USA. *Croat. Med. J.* 52 (3): 280-292. doi: 10.3325/cmj.2011.52.280
- Shannon L. M., Boyko R. H., Castelhana M., Corey E., Hayward J. J., McLean C., White M. E., Abi Said M., Anita B. A., Bondjengo N.I., Calero J., Galov A., Hedimbi M., Imam B., Khalap R., Lally D., Masta A., Oliveira K. C., Pérez L., Randall J., Tam N. M., Trujillo-Cornejo F. J., Valeriano C., Sutter N. B., Todhunter R. J., Bustamante C. D., Boyko A. R. (2015). Genetic structure in village dogs reveals a Central Asian domestication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (44): 13639-13644. doi: 10.1073/pnas.1516215112
- Špoljarić B. (2008). Hrvatska kinološka baština. Hrvatski kinološki savez, Zagreb, Hrvatska, str. 95-100

- Suárez N. M., Betancor E., Fregel R., Pestano J. (2013). Genetic characterization, at the mitochondrial and nuclear DNA levels, of five Canary Island dog breeds. *Anim. Genet.* 44 (4): 432-441. doi: 10.1111/age.12024
- Sutter N. B., Ostrander E. A. (2004). Dog star rising: the canine genetic system. *Nat. Rev. Genet.* 5 (12): 900-910
- Talenti A., Dreger D. L., Frattini S., Polli M., Marelli S., Harris A. C., Liotta L., Cocco R., Hogan A. N., Bigi D., Caniglia R., Parker H. G., Pagnacco G., Ostrander E. A., Crepaldi P. (2018). Studies of modern Italian dog populations reveal multiple patterns for domestic breed evolution. *Ecol. Evol.* 8 (5): 2911-2925. doi: 10.1002/ece3.3842
- Toews D. P., Brelsford A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Mol. Ecol. Resour.* 21 (16): 3907-3930. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x
- Tom B. K., Koskinen M. T., Dayton M., Mattila A. M., Johnston E., Fantin D., DeNise S., Spear T., Smith D. G., Satkoski J., Budowle B., Kanthaswamy S. (2010). Development of a Nomenclature System for a Canine STR Multiplex Reagent Kit. *J. f Forensic Sci.* 55 (3): 597-604. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01361.x
- Tornjak – baza pedigree. Izvor: <http://tornjak.pedigree.net/> [Pristupljeno 14.05.2019.]
- Vaysse A., Ratnakumar A., Derrien T., Axelsson E., Rosengren Pielberg G., Sigurdsson S., Fall T., Seppälä E. H., Hansen M. S. T., Lawley C. T., Karlsson E. K., The L. C., Bannasch D., Vilà C., Lohi H., Galibert F., Fredholm M., Häggström J., Hedhammar Å., André C., Lindblad-Toh K., Hitte C., Webster M.T. (2011). Identification of Genomic Regions Associated with Phenotypic Variation between Dog Breeds using Selection Mapping. *PLOS Genet* 7 (10): 1-21. doi: 10.1371/journal.pgen.1002316
- Verscheure S., Backeljau T., Desmyter S. (2013). Reviewing population studies for forensic purposes: Dog mitochondrial DNA. *Zookeys* (365): 381-411. doi: 10.3897/zookeys.365.5859
- Vonholdt B. M., Pollinger J. P., Lohmueller K. E., Han E., Parker H. G., Quignon P., Degenhardt J. D., Boyko A. R., Earl D. A., Auton A., Reynolds A., Bryc K., Brisbin A., Knowles J. C., Mosher D. S., Spady T.C., Elkahouloun A., Geffen E., Pilot M., Jedrzejewski W., Greco C., Randi E., Bannasch D., Wilton A., Shearman J., Musiani M., Cargill M., Jones P. G., Qian Z., Huang W., Ding Z. L., Zhang Y. P., Bustamante C. D., Ostrander E. A., Novembre J., Wayne R. K. (2010). Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* 464 (7290): 898-902. doi: 10.1038/nature08837

- Webb K. M., Allard M. W. (2009). Mitochondrial genome DNA analysis of the domestic dog: identifying informative SNPs outside of the control region. *J. Forensic Sci.* 54 (2): 275-288. doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00952.x
- Weiner J., Parida S. K., Maertzdorf J., Black G. F., Repsilber D., Telaar A., Mohny R. P., Arndt-Sullivan C., Ganoza C. A., Faé K. C., Walzl G., Kaufmann S. H. (2012). Biomarkers of Inflammation, Immunosuppression and Stress Are Revealed by Metabolomic Profiling of Tuberculosis Patients. *PLoS One* 7 (7): 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0040221
- Wickham H. (2011). The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *J. Stat. Softw.* 40 (1): 1-29
- Wright S. (1977). *Evolution and the genetics of populations. Vol. 3, Experimental results and evolutionary deductions.* University of Chicago Press, Chicago, IL, SAD.
- Yakes F. M., Van Houten B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (2): 514-519. doi: 10.1073/pnas.94.2.514

8 ŽIVOTOPIS

Mateja Janeš rođena je 24. travnja 1986. godine. Osnovnu školu i V. prirodoslovno-matematičku gimnaziju završila je u Zagrebu. Preddiplomski studij Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2005. godine i 2009. godine stječe titulu sveučilišnog prvostupnika. Iste godine upisuje diplomski studij Genetika i oplemenjivanje životinja te 2012. godine stječe titulu magistre inženjerke agronomije. Za vrijeme diplomskog studija dobitnica je stipendije CEEPUS u sklopu koje pohađa ljetnu školu „Molekularna biologija u akvakulturi“ na Sveučilištu St. Istvan u Godollu, Mađarskoj. Doktorski studij Poljoprivredne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje akademske godine 2011/2012. Od početka 2011. godine volontirala je na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju na kontroli kvalitete matice registriranih uzgajivača matice sive pčele, a od 2011. do danas suradnica je na modulu Kinologija. Bila je član tehničkog uredništva časopisa „Journal of Central European Agriculture“ (JCEA) do 12. mjeseca 2013. godine. Prezentirala je rad „Morfološke odlike spolnih organa matice sive pčele (*Apis mellifera carnica*)“ na 47. hrvatskom i 7. međunarodnom simpoziju agronoma u Opatiji 2012. godine. Mateja je bila učesnica COST projekta FA0803 – COLOSS (Prevention of honeybee colony losses) u radnoj grupi 4 – Diversity and Vitality. Na osnovi sažetaka u sklopu radne grupe 4 prisustvovala je na radionici „Bee Book and data analysis of GEI experiment“ koja se održavala u Jokioinenu u Finskoj u trajanju od tjedan dana. U sklopu kampanje COLOSS Short time scientific mission (STSM) boravila je na Institutu za pčelarstvo u Kirrhainu u Njemačkoj u trajanju od 12 dana, u ožujku 2012. godine, u sklopu čega je radila na Diversifikaciji Noseme i proučavanju virusa kod pčela. Sudjelovala je na simpoziju „International Symposium about the Carniolan honeybee“ koji se održavao u Celju u Sloveniji. U travnju 2013. sudjelovala je na 10. međunarodnom savjetovanju i sajmu opreme Humanitarno razminiranje 2013. u Šibeniku, a od siječnja 2014. radila je na pripremi i organizaciji znanstvenog skupa Prve međunarodne konferencije Taste the Mediterranean koja je održana od 29. svibnja do 1. lipnja 2014. u Šibeniku. Od listopada 2014. u sklopu bilateralnog projekta „Upotreba varijabilnosti mtDNA sekvence u provjeri točnosti rodovnika i procjeni citoplazmatskih utjecaja“ završava laboratorijski dio disertacije na Biotehničkom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija. Dobitnica je stipendije CEEPUS u trajanju od 20. ožujka 2015. do 20. rujna 2015. i stipendije CEEPUS freemover u trajanju od 1. listopada 2015. do 1. kolovoza 2016., kao i stipendije Erasmus+ praksa u periodu od 1. rujna 2016. do 1. srpnja 2017. u sklopu kojih je boravila na Biotehničkom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani.

Dana 15. rujna 2017. godine osvojila je treću nagradu za izvrsno predavanje pod naslovom „Population variability of tibetan terrier“ na 6. kolokviju iz genetike Slovenskog genetskog društva u Ljubljani u Sloveniji. Na 69. godišnjoj međunarodnoj konferenciji EAAP u Dubrovniku 27. kolovoza 2018. drži predavanje „Genetic diversity of Tibetan Terrier“, a 15. rujna 2018. održala je kratko predavanje iz teme doktorske disertacije na Prvom danu doktorata Poslijediplomskog doktorskog studija Poljoprivredne znanosti Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2. rujna 2019. zaposlena je na Roslin Institutu Sveučilišta u Edinburghu u Škotskoj kao postdoktorand na projektu „Canine Inbreeding“. Kao prva autorica do sada je objavila jedan znanstveni rad indeksiran u a1 i jedan u a2 bazi. Sudjelovala je na tri međunarodne konferencije s tri usmena izlaganja i jednim poster-izlaganjem.

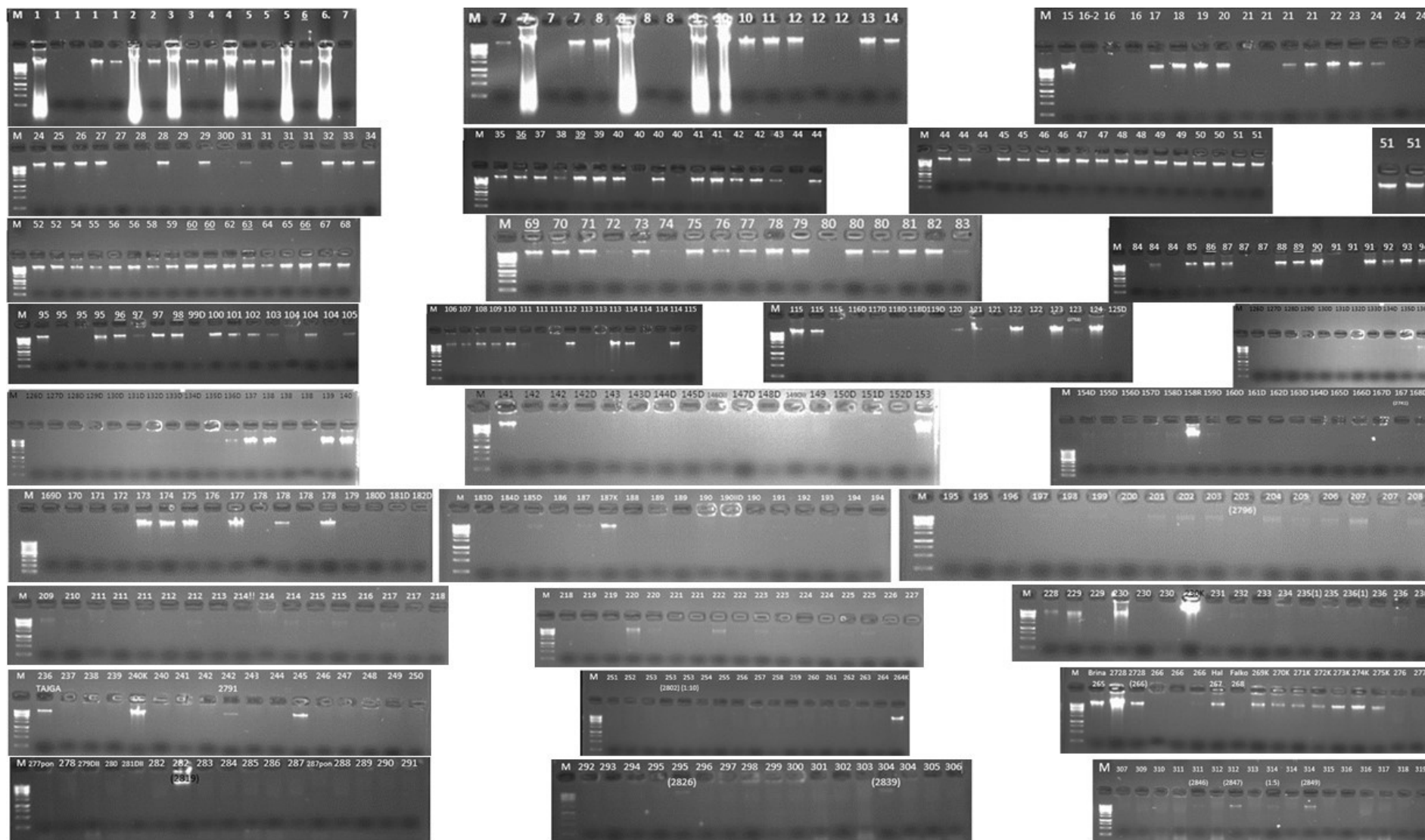
Znanstveni rad iz skupine a1:

1. Janeš M., Zorc M., Cubrić-Curik V., Curik I., Dovc P. (2019). Population structure and genetic history of Tibetan Terriers. *Genet Sel Evol* 51:79

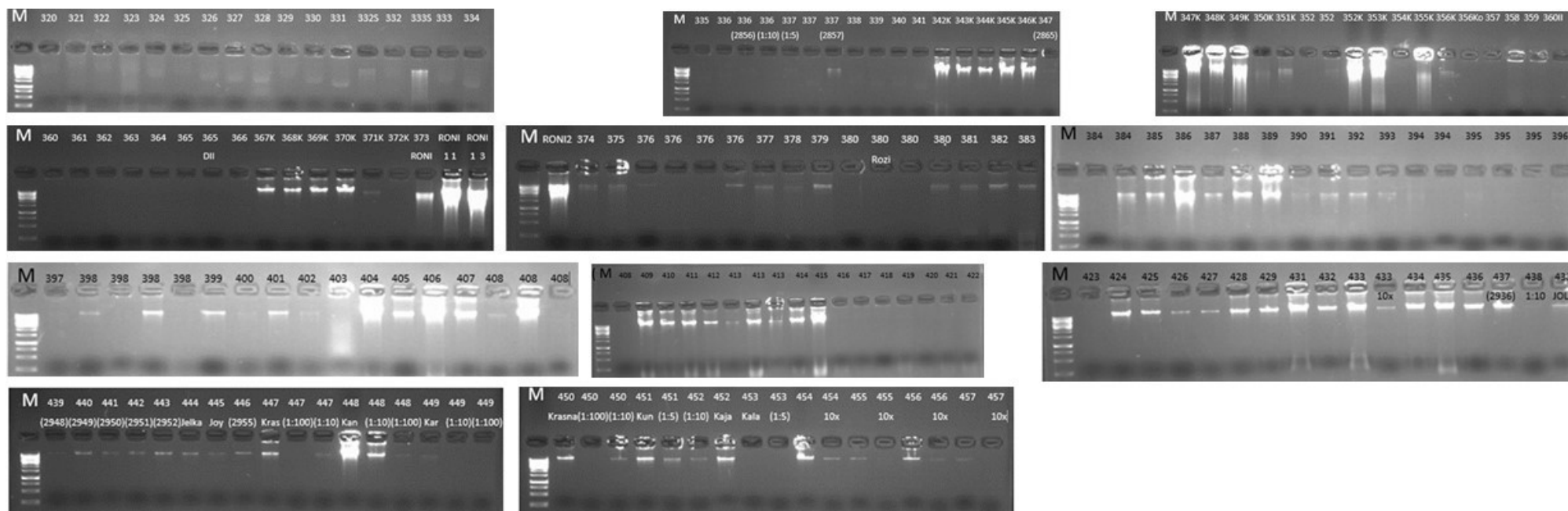
Znanstveni rad iz skupine a2:

1. Janeš M., Brajkovic V., Drzaic I., Zorc M., Dovc P., Cubric-Curik V. (2019). Mitochondrial variability of Small Međimurje dog. *Agric. conspec. sci.* 84 (2):203-9

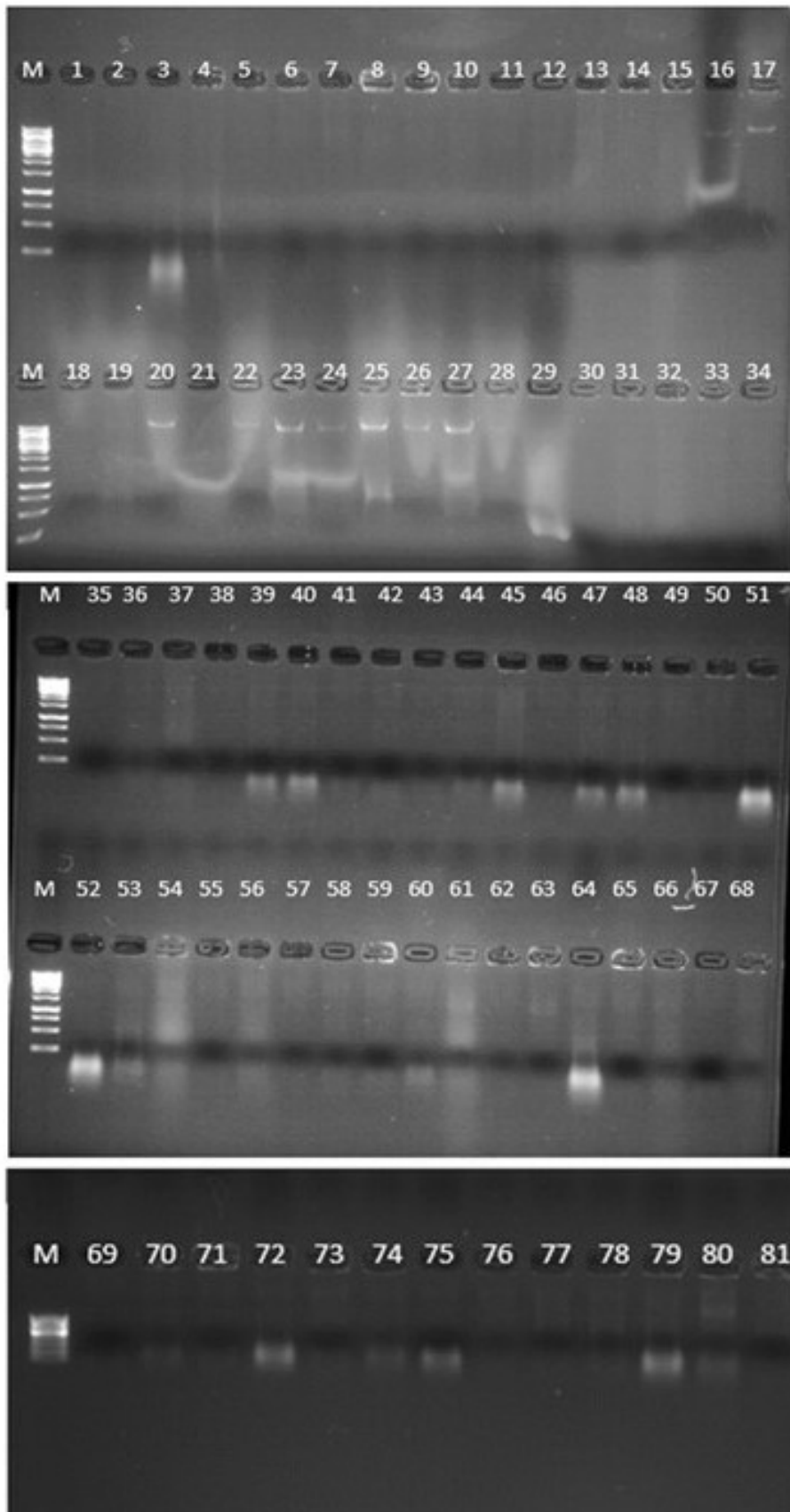
9 PRILOZI



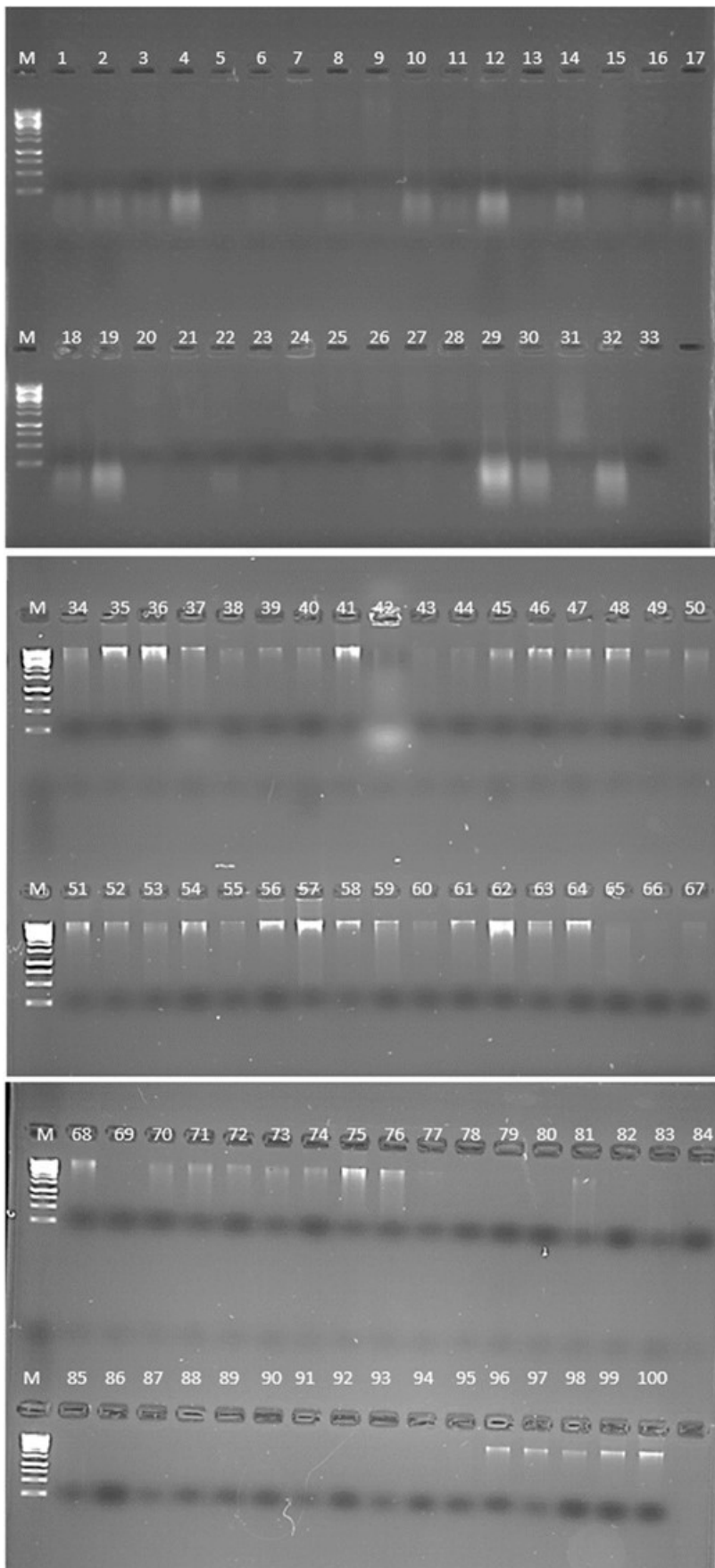
Slika 60. Integritet DNA 457 uzoraka kraškog ovčara prikazan na gel elektroforezi.



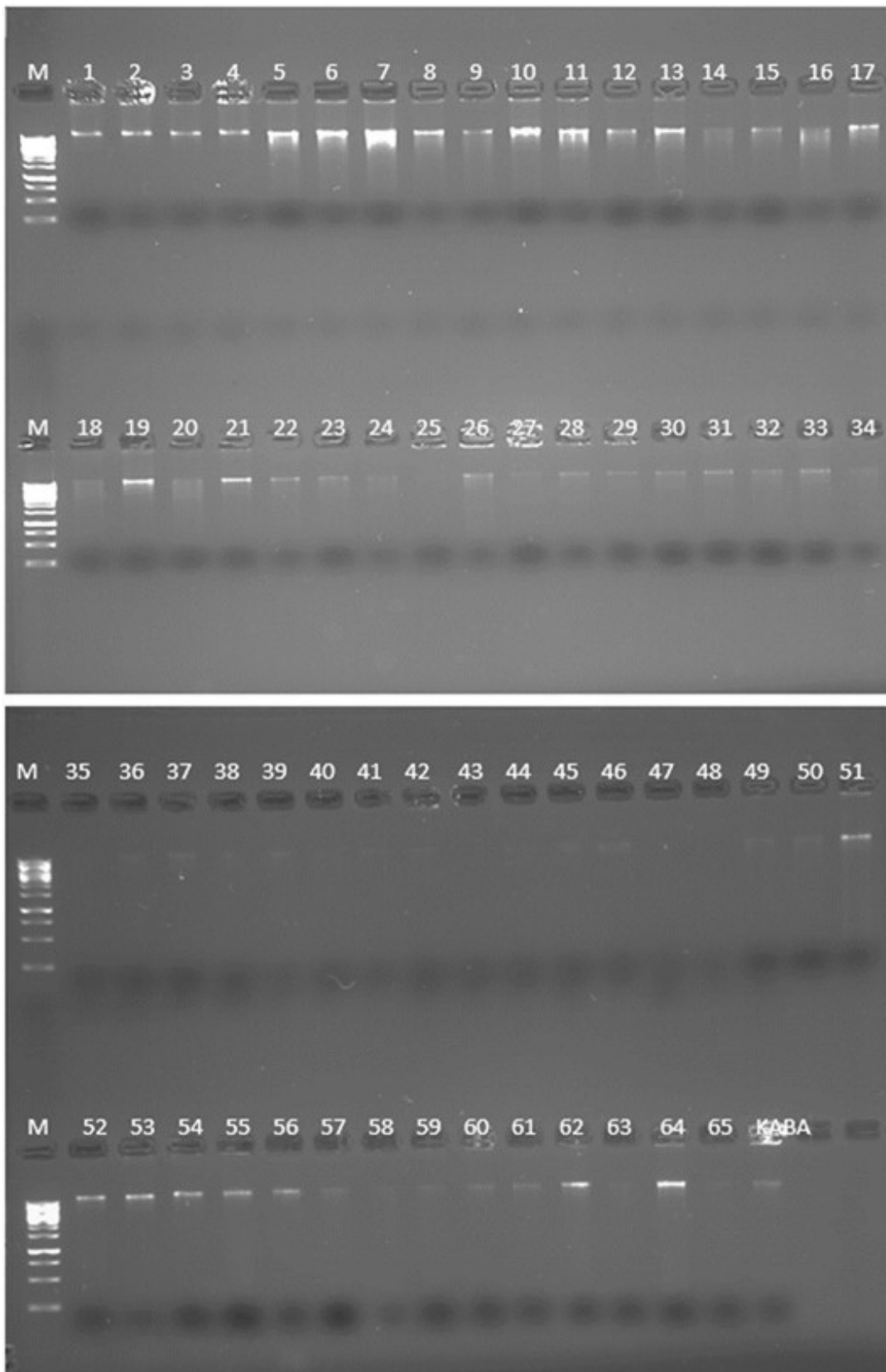
Slika 56. Integritet DNA 457 uzoraka kraškog ovčara prikazan na gel elektroforezi.



Slika 61. Integritet DNA 81 uzorka šarplaninaca prikazan na gel elektroforezi.



Slika 62. Integritet uzorka 100 tornjaka prikazan na gel elektroforezi.



Slika 63. Integritet DNA četiri uzorka vuka i 62 uzorka tibetskog terijera. (Uzorci vukova broj 1 do broja 4, ostalo tibetanci.)

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	1.1	2.036	568
kraški ovčar	1.2	1.222	5.5
kraški ovčar	1.3	1.5	>800
kraški ovčar	1.4	1.75	14
kraški ovčar	1.5	1.375	5.5
kraški ovčar	2.1	----	>800
kraški ovčar	2.2	1.778	16
kraški ovčar	3.1	1.781	1036
kraški ovčar	3.2	2	16
kraški ovčar	4.1	2	13
kraški ovčar	4.2	1.969	576
kraški ovčar	5.1	1.933	14.5
kraški ovčar	5.2	1.882	16
kraški ovčar	5.3	1.706	1087
kraški ovčar	6	1.923	25
kraški ovčar	6-	1.549	1104
kraški ovčar	7.1	2.5	<5
kraški ovčar	7.3	2.002	402
kraški ovčar	7.4	1.222	5.5
kraški ovčar	7.5	1.483	21.5
kraški ovčar	8.1	1.594	25.5
kraški ovčar	8.2	1.447	1139
kraški ovčar	8.3	2.2	5.5
kraški ovčar	8.4	2	1
kraški ovčar	9	2.018	674
kraški ovčar	10.1	2.019	434
kraški ovčar	10.2	1.833	16.5
kraški ovčar	11	1.926	26
kraški ovčar	12.1	1.462	28.5
kraški ovčar	12.2	1.5	<5
kraški ovčar	12.3	1	<5
kraški ovčar	13	1.882	32
kraški ovčar	14	1.833	11
kraški ovčar	15	1.852	25
kraški ovčar	16.1	1.19	12.5
kraški ovčar	16.2	2	<5
kraški ovčar	16.3	1	<5
kraški ovčar	17	2	14
kraški ovčar	18	1.786	25
kraški ovčar	19	1.905	20
kraški ovčar	20	1.905	20

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	21.1	1.333	12
kraški ovčar	21.2	1	<5
kraški ovčar	21.4	1.667	12.5
kraški ovčar	22	1.833	16.5
kraški ovčar	23	1.929	13.5
kraški ovčar	24.2	1	<5
kraški ovčar	24.3	0	<5
kraški ovčar	25	1.944	17.5
kraški ovčar	26	2	17
kraški ovčar	27	1.725	34.5
kraški ovčar	27.2	1.667	2.5
kraški ovčar	28.1	1.917	11.5
kraški ovčar	28.2	1.3	6.5
kraški ovčar	29.1	1.75	10.5
kraški ovčar	29.2	1.714	6
kraški ovčar	30D	1.667	2.5
kraški ovčar	31.2	1.909	10.5
kraški ovčar	31.3	1	<5
kraški ovčar	31.4	1.846	12
kraški ovčar	32	1.909	10.5
kraški ovčar	33	1.933	14.5
kraški ovčar	34	1.857	13
kraški ovčar	36	2	11
kraški ovčar	36-	1.947	18.5
kraški ovčar	37	1.889	8.5
kraški ovčar	38	1.783	20.5
kraški ovčar	39	1.929	13.5
kraški ovčar	39-		nema uzorka DNA
kraški ovčar	40.1	1.5	6
kraški ovčar	40.2	1.733	13
kraški ovčar	40.3	1.5	1.5
kraški ovčar	40.4	1.833	22
kraški ovčar	41.1	2.111	19
kraški ovčar	41.2	2	9
kraški ovčar	42.1	1.8	13.5
kraški ovčar	42.2	1.667	5
kraški ovčar	43	1	<5
kraški ovčar	44.1	2.125	8.5
kraški ovčar	44.2	1.917	11.5
kraški ovčar	44.3	1.5	10.5
kraški ovčar	44.4	2.333	3.5

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	44.5	1.923	12.5
kraški ovčar	45.1	1.636	9
kraški ovčar	45.2	1.824	15.5
kraški ovčar	46.1	1.952	20.5
kraški ovčar	46.2	1.864	20.5
kraški ovčar	47.1	2	13
kraški ovčar	47.2	1.895	18
kraški ovčar	48.1	1.868	35.5
kraški ovčar	48.2	1.875	15
kraški ovčar	49.1	2	18
kraški ovčar	49.2	1.933	14.5
kraški ovčar	50.1	1.944	17.5
kraški ovčar	50.2		nema uzorka DNA
kraški ovčar	51.1	1.933	14.5
kraški ovčar	51.2	2	14
kraški ovčar	52.1	2	20
kraški ovčar	52.2	1.929	13.5
kraški ovčar	54	1.875	7.5
kraški ovčar	55	2.667	4
kraški ovčar	56	2	11
kraški ovčar	56Čana	2.286	8
kraški ovčar	59	2.286	8
kraški ovčar	58	2.167	6.5
kraški ovčar	60.1	2	14
kraški ovčar	60.2	2.3	11.5
kraški ovčar	62	2.091	11.5
kraški ovčar	63	2.062	16.5
kraški ovčar	64	2.333	7
kraški ovčar	65	1.933	14.5
kraški ovčar	66	1.917	11.5
kraški ovčar	67	1.783	20.5
kraški ovčar	68	2	10
kraški ovčar	69	2.5	10
kraški ovčar	70	2.2	11
kraški ovčar	71	2.111	9.5
kraški ovčar	72	-1	0.5
kraški ovčar	73	2.143	7.5
kraški ovčar	74	----	1
kraški ovčar	75	2.167	6.5
kraški ovčar	76	2.4	6
kraški ovčar	77	2.333	7

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	78	2.3	11.5
kraški ovčar	79	2.125	8.5
kraški ovčar	80.1	-1	0.5
kraški ovčar	81	2.1	10.5
kraški ovčar	82	2.429	8.5
kraški ovčar	83	----	1.5
kraški ovčar	84.1	1.286	9
kraški ovčar	84.2	2.333	3.5
kraški ovčar	84.3	0.667	----
kraški ovčar	85	2.167	6.5
kraški ovčar	86	2	14
kraški ovčar	87.1	1.8	13.5
kraški ovčar	87.2	1.333	14
kraški ovčar	88	2.154	14
kraški ovčar	89	2.143	15
kraški ovčar	90	2	19
kraški ovčar	91.1	1.286	9
kraški ovčar	91.2	1	----
kraški ovčar	91.3	2	22
kraški ovčar	92	2.667	8
kraški ovčar	93	2.125	17
kraški ovčar	94	2	16
kraški ovčar	95.1	2.083	12.5
kraški ovčar	95.1-	1.351	25
kraški ovčar	95.2	1.4	3.5
kraški ovčar	95.2-	2.182	12
kraški ovčar	96	2.1	10.5
kraški ovčar	97.1	3	3
kraški ovčar	97.2		
kraški ovčar	98	1.633	40
kraški ovčar	99D	2.5	2.5
kraški ovčar	100	2	8
kraški ovčar	101	2	6
kraški ovčar	102	2	5
kraški ovčar	103	-1	0.5
kraški ovčar	104.1	1	2.5
kraški ovčar	104.2	1.833	5.5
kraški ovčar	104.3	1.333	----
kraški ovčar	105	----	1.5
kraški ovčar	106	2.667	4
kraški ovčar	107	4	2

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	108	2.167	6.5
kraški ovčar	109	5	2.5
kraški ovčar	110	2.143	7.5
kraški ovčar	111.1	1	1
kraški ovčar	111.2	3	-----
kraški ovčar	111.3	1.333	2
kraški ovčar	112	2.143	7.5
kraški ovčar	113.1	1.333	-----
kraški ovčar	113.2	1.107	15.5
kraški ovčar	113.3	1.885	24.5
kraški ovčar	114.1	1.938	15.5
kraški ovčar	114.2	----	1
kraški ovčar	114.3	1	-----
kraški ovčar	114.4	1.25	22.5
kraški ovčar	115.1	1.333	-----
kraški ovčar	115.2	1.861	33.5
kraški ovčar	115.4	1.75	3.5
kraški ovčar	116D	4	2
kraški ovčar	117D	-2	1
kraški ovčar	118D1	1	-----
kraški ovčar	118D2	1	-----
kraški ovčar	119D	-1	0.5
kraški ovčar	120	2.043	23.5
kraški ovčar	121.1	1.794	380
kraški ovčar	122.1	1.963	26.5
kraški ovčar	122.2	1.75	3.5
kraški ovčar	123	2.143	15
kraški ovčar	123(2753)	1	0.5
kraški ovčar	124	1.867	28
kraški ovčar	125D	3	3
kraški ovčar	126D	2.25	4.5
kraški ovčar	127D	3	3
kraški ovčar	128D	-2	1
kraški ovčar	129D	-1	0.5
kraški ovčar	130D	2.2	5.5
kraški ovčar	131D	5	2.5
kraški ovčar	132D	3	3
kraški ovčar	133D	0	0
kraški ovčar	134D	3.5	3.5
kraški ovčar	135D	0	0
kraški ovčar	136D	2.214	15.5

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	137	1.929	13.5
kraški ovčar	138.1	1.846	12
kraški ovčar	138.3	1.429	<5
kraški ovčar	139	1.87	21.5
kraški ovčar	140	1.864	20.5
kraški ovčar	141	1.842	17.5
kraški ovčar	142D	1.75	<5
kraški ovčar	142.1	----	<5
kraški ovčar	142.2	1.286	<5
kraški ovčar	143	2	<5
kraški ovčar	143D	1.75	<5
kraški ovčar	144D	2.5	<5
kraški ovčar	145D	2.333	<5
kraški ovčar	146D	0.694	25
kraški ovčar	147D	1.667	<5
kraški ovčar	148D	4	<5
kraški ovčar	149	0.933	48.5
kraški ovčar	147D2	0.676	23
kraški ovčar	150	1.833	5.5
kraški ovčar	151D	2.1	10.5
kraški ovčar	152D	2	<5
kraški ovčar	153	2	11
kraški ovčar	154	2.083	12.5
kraški ovčar	155D	2	6
kraški ovčar	156D	1.556	14
kraški ovčar	157D	1.875	7.5
kraški ovčar	158K	1.851	43.5
kraški ovčar	158D	2.5	7.5
kraški ovčar	159D	1.765	15
kraški ovčar	160D	1.8	4.5
kraški ovčar	161D	2	4
kraški ovčar	162D	3	<5
kraški ovčar	163D	2	<5
kraški ovčar	164D	3	<5
kraški ovčar	165D	----	<5
kraški ovčar	166D	2.333	<5
kraški ovčar	167	2.5	<5
kraški ovčar	167D	5	<5
kraški ovčar	168D	2.2	5.5
kraški ovčar	169D	2.667	<5
kraški ovčar	170	-3	<5

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	171	5	<5
kraški ovčar	172	5	<5
kraški ovčar	173	1.912	32.5
kraški ovčar	174	1.966	28.5
kraški ovčar	175	1.931	28
kraški ovčar	176	2.25	<5
kraški ovčar	177	1.962	25.5
kraški ovčar	178.1	2.5	<5
kraški ovčar	178.2	2.2	5.5
kraški ovčar	178.3	-1	<5
kraški ovčar	178.4	1.909	21
kraški ovčar	179	5	<5
kraški ovčar	180D	2	<5
kraški ovčar	181D	5	<5
kraški ovčar	182D	3	<5
kraški ovčar	183D	2.2	5.5
kraški ovčar	184D	5	<5
kraški ovčar	185D	2.167	6.5
kraški ovčar	186	2.2	5.5
kraški ovčar	187	----	<5
kraški ovčar	187K	2.083	12.5
kraški ovčar	188	1.4	<5
kraški ovčar	189.1	0.856	62.5
kraški ovčar	189.2	2	4
kraški ovčar	190.1	0.875	87.5
kraški ovčar	190.2	2.5	<5
kraški ovčar	1902D	0.922	59
kraški ovčar	191	----	<5
kraški ovčar	192	5	<5
kraški ovčar	193	5	<5
kraški ovčar	194.1	----	<5
kraški ovčar	194.2	0.698	119
kraški ovčar	195.1	0.854	55.5
kraški ovčar	195.2	2	<5
kraški ovčar	196	----	<5
kraški ovčar	197	1.667	<5
kraški ovčar	198	2.5	<5
kraški ovčar	199	3	<5
kraški ovčar	200	1.75	<5
kraški ovčar	201	5	<5
kraški ovčar	202	2.6	6.5

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	203	2.4	6
kraški ovčar	203(2736)	4	<5
kraški ovčar	204	2.167	13
kraški ovčar	205	2.25	<5
kraški ovčar	206	2.286	8
kraški ovčar	207.2	1.038	122
kraški ovčar	207	2	15
kraški ovčar	208	2.4	6
kraški ovčar	209	2	13
kraški ovčar	210	1.71	26.5
kraški ovčar	211.1	0.817	96
kraški ovčar	211.2	4	<5
kraški ovčar	211.3	2.5	5
kraški ovčar	212.1	1.556	----
kraški ovčar	212.2	1.833	11
kraški ovčar	213	1.444	----
kraški ovčar	214	1.4	----
kraški ovčar	214.2	0.781	106
kraški ovčar	214.3	1.333	----
kraški ovčar	215	1.5	----
kraški ovčar	215.2	2	2
kraški ovčar	216	1.333	----
kraški ovčar	217	1	----
kraški ovčar	217.2	1.5	----
kraški ovčar	218	1.333	----
kraški ovčar	218.2	1.222	----
kraški ovčar	219	1.25	----
kraški ovčar	219.2	1.143	----
kraški ovčar	220	3.333	5
kraški ovčar	220.2	1.429	----
kraški ovčar	221.2	1.375	----
kraški ovčar	222	0.333	----
kraški ovčar	223	1.25	----
kraški ovčar	222.2	1.4	----
kraški ovčar	223.2	1.5	----
kraški ovčar	224	1	----
kraški ovčar	224.2	1.556	----
kraški ovčar	225	1.625	----
kraški ovčar	225.2	-0.667	1
kraški ovčar	226	1.375	----
kraški ovčar	227	1.333	----

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	228	-0.5	0.5
kraški ovčar	229.1	1.773	19.5
kraški ovčar	229.2	1.625	-----
kraški ovčar	230.1	1.95	39
kraški ovčar	230.2	1.4	-----
kraški ovčar	230.3	0.58	104
kraški ovčar	230.4	1.901	106
kraški ovčar	231	1.222	-----
kraški ovčar	232	1	-----
kraški ovčar	233	1.143	-----
kraški ovčar	234	0.5	0.5
kraški ovčar	235	0.993	72
kraški ovčar	235(1)	0.929	84.5
kraški ovčar	236	0.747	34
kraški ovčar	236(1)	0.794	38.5
kraški ovčar	236TAJGA	1.786	12.5
kraški ovčar	236.2	1.444	-----
kraški ovčar	236.3	1.5	-----
kraški ovčar	237	0.817	78
kraški ovčar	238	0.747	57.5
kraški ovčar	239	0.752	48.5
kraški ovčar	240	0.921	163
kraški ovčar	240K	2.036	28.5
kraški ovčar	241	0.848	81
kraški ovčar	242	0.76	47.5
kraški ovčar	243	1.054	77.5
kraški ovčar	243(2791)	2	-----
kraški ovčar	244	0.857	75
kraški ovčar	245	2.25	9
kraški ovčar	246	0.87	94
kraški ovčar	247	0.895	68.5
kraški ovčar	248	0.789	89.5
kraški ovčar	249	0.871	125
kraški ovčar	250	0.76	74.5
kraški ovčar	251	0.853	87
kraški ovčar	252	0.934	78
kraški ovčar	253	0.935	86.5
kraški ovčar	253(2802)	1.333	-----
kraški ovčar	253 1:10	1.545	-----
kraški ovčar	254	1.079	116
kraški ovčar	255	0.877	71

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	256	0.988	81.5
kraški ovčar	257	0.764	69.5
kraški ovčar	258	0.995	98.5
kraški ovčar	259	0.878	65
kraški ovčar	260	0.923	65.5
kraški ovčar	261	0.872	82
kraški ovčar	262	0.843	72.5
kraški ovčar	263	0.962	88
kraški ovčar	264	0.819	59
kraški ovčar	264K	2	13
kraški ovčar	BRNA265	1.963	26.5
kraški ovčar	266	1.333	-----
kraški ovčar	266.2	1.727	-----
kraški ovčar	266.3	2.333	-----
kraški ovčar	HAL267	2.8	7
	FALKO SILVER		
kraški ovčar	268	0.876	74.5
kraški ovčar	269K	3	3
kraški ovčar	270K	2.4	6
kraški ovčar	271K	7	3.5
kraški ovčar	272K	1.667	5
kraški ovčar	2728	1.772	128
kraški ovčar	2728 (266)	2.143	15
kraški ovčar	273K	2.333	7
kraški ovčar	274K	3	4.5
kraški ovčar	275K	2.2	5.5
kraški ovčar	276	1.01	96.5
kraški ovčar	277	0.956	108
kraški ovčar	277PON	0.933	49
kraški ovčar	278	0.954	93.5
kraški ovčar	279D2	0.863	79
kraški ovčar	280	0.905	99.5
kraški ovčar	281D2	0.75	55.5
kraški ovčar	282	0.884	95
kraški ovčar	282(2819)	1.6	4
kraški ovčar	283	1.012	83
kraški ovčar	284	0.946	95.5
kraški ovčar	285	0.87	120
kraški ovčar	286	1.027	134
kraški ovčar	287	0.925	117
kraški ovčar	287PON	0.824	42

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	288	0.976	103
kraški ovčar	289	0.827	40.5
kraški ovčar	290	0.774	41
kraški ovčar	291	0.808	42
kraški ovčar	292	0.8	40
kraški ovčar	293	0.689	25.5
kraški ovčar	294	0.878	43
kraški ovčar	295	0.716	26.5
kraški ovčar	295(2826)	2.333	-----
kraški ovčar	296	0.814	28.5
kraški ovčar	297	0.882	41
kraški ovčar	298	0.808	48.5
kraški ovčar	299	0.754	52
kraški ovčar	300	0.836	53.5
kraški ovčar	301	0.857	102
kraški ovčar	302	0.73	73
kraški ovčar	303	0.809	245
kraški ovčar	304	0.726	128
kraški ovčar	304(2839)	1.447	34
kraški ovčar	305	0.792	93.5
kraški ovčar	306	0.884	83.5
kraški ovčar	307	0.803	26.5
kraški ovčar	309	0.817	98.5
kraški ovčar	310	0.856	122
kraški ovčar	311	0.968	137
kraški ovčar	311(2846)	----	-----
kraški ovčar	312		nema DNA uzorka
kraški ovčar	312(2847)		nema DNA uzorka
kraški ovčar	313	0.778	70
kraški ovčar	314	1.714	-----
kraški ovčar	314(2849)	1.273	-----
kraški ovčar	314 1:5	0.917	132
kraški ovčar	215	1.692	11
kraški ovčar	316	0.945	137
kraški ovčar	316.2	0.882	182
kraški ovčar	317	0.794	102
kraški ovčar	318	0.839	62.5
kraški ovčar	319	0.805	78.5
kraški ovčar	320	0.718	89
kraški ovčar	321		nema DNA uzorka
kraški ovčar	322	0.901	124

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	323	0.878	97
kraški ovčar	324	0.854	79
kraški ovčar	325	0.798	106
kraški ovčar	326	0.898	102
kraški ovčar	327	0.795	116
kraški ovčar	328	0.816	88.5
kraški ovčar	329	0.807	94
kraški ovčar	330	0.779	106
kraški ovčar	331	0.767	87
kraški ovčar	332	1.429	-----
kraški ovčar	332S	0.82	95.5
kraški ovčar	333	0.5	-----
kraški ovčar	333S	0.971	117
kraški ovčar	334	0.854	70
kraški ovčar	335	0.815	99
kraški ovčar	336	0.75	3
kraški ovčar	336 1:16	1.833	-----
kraški ovčar	336(2856)	0.869	99.5
kraški ovčar	337	2	-----
kraški ovčar	337 1:5	2.5	10
kraški ovčar	337(2857)	0.935	143
kraški ovčar	338	0.797	94.5
kraški ovčar	339	0.728	110
kraški ovčar	340	0.947	116
kraški ovčar	341	1.923	87.5
kraški ovčar	342K	2	27
kraški ovčar	343K		Nema DNA uzorka
kraški ovčar	344K	1.93	55
kraški ovčar	345K	2	36
kraški ovčar	346K	1.856	290
kraški ovčar	347K	1.8	-----
kraški ovčar	347(2863)	1.833	252
kraški ovčar	348K	1.75	224
kraški ovčar	349K		Nema DNA uzorka
kraški ovčar	146	0.946	44
kraški ovčar	350K	1.609	18.5
kraški ovčar	351K	1.728	127
kraški ovčar	352K	1.776	75.5
kraški ovčar	352.1	1.357	9.5
kraški ovčar	352.2	2.5	2.5
kraški ovčar	353K	1.515	249

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	354K	1.5	1.5
kraški ovčar	355K	1.496	93.5
kraški ovčar	356K	1.778	8
kraški ovčar	356KO	0.731	24.5
kraški ovčar	357	0.956	32.5
kraški ovčar	358	1.01	99
kraški ovčar	359	0.92	69
kraški ovčar	360	0.752	184
kraški ovčar	360 2	0.739	52.5
kraški ovčar	361	0.665	60.5
kraški ovčar	362	0.71	68.5
kraški ovčar	363	0.668	71.5
kraški ovčar	365	0.707	106
kraški ovčar	365 D2	0.697	57.5
kraški ovčar	366	0.677	66
kraški ovčar	367K	1.897	37
kraški ovčar	368K	1.889	34
kraški ovčar	369K	1.886	41.5
kraški ovčar	370K	1.837	79
kraški ovčar	371K	1.9	9.5
kraški ovčar	372D	0.741	43
kraški ovčar	374	1.938	46.5
kraški ovčar	375	1.979	46.5
kraški ovčar	376.3	1	-----
kraški ovčar	377	1.968	30.5
kraški ovčar	378	2	38
kraški ovčar	379	2.014	73.5
kraški ovčar	380.3	1.333	2
kraški ovčar	380.4	2.016	61.5
kraški ovčar	392	2	20
kraški ovčar	382	2.041	75.5
kraški ovčar	385	1.767	38
kraški ovčar	380.2	1.9	9.5
kraški ovčar	386	1.903	59
kraški ovčar	388	1.977	42.5
kraški ovčar	364	0.743	75
kraški ovčar	394.2	1.5	4.5
kraški ovčar	387	1.909	21
kraški ovčar	396	1.923	12.5
kraški ovčar	398.2	1.5	4.5
kraški ovčar	390	1.833	16.5

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	389	1.649	155
kraški ovčar	395.2	1.4	3.5
kraški ovčar	397	2.154	14
kraški ovčar	398.3	2	34
kraški ovčar	391	1.973	36.5
kraški ovčar	380.1	1.214	17
kraški ovčar	376	2	2
kraški ovčar	398.1	2	6
kraški ovčar	384.1	0.125	0.5
kraški ovčar	384.2	1.971	34.5
kraški ovčar	395.3	1	-----
kraški ovčar	399	2.05	20.5
kraški ovčar	383	2.073	99.5
kraški ovčar	394	1.889	8.5
kraški ovčar	395	1.941	16.5
kraški ovčar	393	2.1	10.5
kraški ovčar	381	2.043	71.5
kraški ovčar	398.4	1.5	-----
kraški ovčar	445	1.75	10.5
kraški ovčar	454	----	0.5
kraški ovčar	460	1.571	5.5
kraški ovčar	411	1.989	89.5
kraški ovčar	408.2	1.929	82
kraški ovčar	424	1.939	32
kraški ovčar	426	2.5	5
kraški ovčar	498	1.903	29.5
kraški ovčar	450 1:10	2	1
kraški ovčar	400	2	9
kraški ovčar	401	2	23
kraški ovčar	461	----	0
kraški ovčar	408	2	1
kraški ovčar	402	2	17
kraški ovčar	413.3	1.483	44.5
kraški ovčar	485	3	3
kraški ovčar	409	1.935	120
kraški ovčar	414	1.925	64.5
kraški ovčar	455 10X	----	0
kraški ovčar	471	1.769	11.5
kraški ovčar	483	1.833	33
kraški ovčar	461	1.556	14
kraški ovčar	408.3	1.571	5.5

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	406	1.919	130
kraški ovčar	481	1.045	57.5
kraški ovčar	403	1.017	470
kraški ovčar	476	2.5	5
kraški ovčar	484	1.688	13.5
kraški ovčar	474	2	6
kraški ovčar	448 (1:10)	1.692	22
kraški ovčar	450 (1:100)	1.5	-----
kraški ovčar	458	1.273	7
kraški ovčar	415	1.968	62
kraški ovčar	433	1.967	121
kraški ovčar	413.2	1.982	113
kraški ovčar	410	1.915	45
kraški ovčar	469	1.786	12.5
kraški ovčar	453KALA	----	0
kraški ovčar	448KAZ	1.807	136
kraški ovčar	463	1.481	20
kraški ovčar	447(1:10)	1	-----
kraški ovčar	462	1.833	11
kraški ovčar	422	0.904	317
kraški ovčar	434	2	49
kraški ovčar	425	1.941	16.5
kraški ovčar	436	1.961	50
kraški ovčar	479	1.135	42
kraški ovčar	431	1.987	79.5
kraški ovčar	465 10X	----	-----
kraški ovčar	453 1:5	1	-----
kraški ovčar	428	1.897	27.5
kraški ovčar	457 10X	1	1
kraški ovčar	407	1.985	64.5
kraški ovčar	440(2949)	1.8	9
kraški ovčar	482	1.333	6
kraški ovčar	451 1:5	1.667	2.5
kraški ovčar	450 KRASNI	1.889	8.5
kraški ovčar	452KAJA	1.952	20.5
kraški ovčar	486	1.5	15
kraški ovčar	452 1:10	1	0.5
kraški ovčar	462 10X	1.333	2
kraški ovčar	449 KAR	2	1
kraški ovčar	487	1.833	93.5

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	458 10X	----	-----
kraški ovčar	420	0.705	233
kraški ovčar	489	1.685	77.5
kraški ovčar	429	1.973	36.5
kraški ovčar	492	1.833	22
kraški ovčar	464 10X	1	-----
kraški ovčar	417	0.929	39.5
kraški ovčar	433 10X	1.667	10
kraški ovčar	466	1.75	10.5
kraški ovčar	432	1.962	25.5
kraški ovčar	464	1.8	4.5
kraški ovčar	439(2948)	1.333	2
kraški ovčar	408.4	1	-----
kraški ovčar	468	1.667	7.5
kraški ovčar	412	2.041	75.5
kraški ovčar	438JOLA	1.667	5
kraški ovčar	472	1.833	16.5
kraški ovčar	491	1.93	41.5
kraški ovčar	454	1.714	18
kraški ovčar	423	0.773	155
kraški ovčar	438 1:10	1	0.5
kraški ovčar	437 (2936)	1.842	17.5
kraški ovčar	447 1:10	1.333	-----
kraški ovčar	443 (2952)	1.571	5.5
kraški ovčar	460 10X	1.467	11
kraški ovčar	496	2	4
kraški ovčar	435	1.981	102
kraški ovčar	421	0.841	217
kraški ovčar	418	0.781	132
kraški ovčar	488	1.832	142
kraški ovčar	459	1.25	10
kraški ovčar	478	0.958	80.5
kraški ovčar	480	1.052	90.5
kraški ovčar	495	2.5	2.5
kraški ovčar	449 1:10	2	-----
kraški ovčar	427	2.333	3.5
kraški ovčar	490	1.545	180
kraški ovčar	467	0.875	28
kraški ovčar	493	1.878	46
kraški ovčar	497	1.8	9
kraški ovčar	416	0.83	232

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
kraški ovčar	494	1.636	9
kraški ovčar	477	1.553	29.5
kraški ovčar	457	1.917	11.5
kraški ovčar	413	1.5	6
kraški ovčar	455	0	0
kraški ovčar	463 10X	2	8
kraški ovčar	473	2.25	4.5
kraški ovčar	441 (2950)	1.25	-----
kraški ovčar	449 1:10	1.8	13.5
kraški ovčar	456 10X	1.75	10.5
kraški ovčar	447KRAS	1.667	7.5
kraški ovčar	465	0.819	226
kraški ovčar	419	1.778	8
kraški ovčar	475	1.889	17
kraški ovčar	405	2	2
kraški ovčar	442 (2951)	1	-----
kraški ovčar	448 1:10	1.222	5.5
kraški ovčar	470	1.893	79.5
kraški ovčar	404	1.778	16
kraški ovčar	451KUN	3	1.5
kraški ovčar	446 (2956)		
šarplaninac	ŠAR 1	1.714	6
šarplaninac	ŠAR 2	0.867	42.5
šarplaninac	ŠAR 3	1.196	162
šarplaninac	ŠAR 4	1.063	100
šarplaninac	ŠAR 5	0.843	67
šarplaninac	ŠAR 6	0.806	52
šarplaninac	ŠAR 7	0.826	59.5
šarplaninac	ŠAR 8	0.883	83
šarplaninac	ŠAR 9	0.809	72
šarplaninac	ŠAR 10	0.824	110
šarplaninac	ŠAR 11	0.814	70
šarplaninac	ŠAR 12	1.019	133
šarplaninac	ŠAR 13	0.972	69
šarplaninac	ŠAR 14	0.892	87
šarplaninac	ŠAR 15	1.066	145
šarplaninac	ŠAR 16	1.324	121
šarplaninac	ŠAR 17	1.327	110
šarplaninac	ŠAR 18	1.407	147
šarplaninac	ŠAR 19	1.309	108
šarplaninac	ŠAR 20	1.429	100

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
šarplaninac	ŠAR 21	1.415	87
šarplaninac	ŠAR 22	1.361	106
šarplaninac	ŠAR 23	1.53	142
šarplaninac	ŠAR 24	1.388	106
šarplaninac	ŠAR 25	1.451	156
šarplaninac	ŠAR 26	1.357	133
šarplaninac	ŠAR 27	1.389	129
šarplaninac	ŠAR 28	1.438	105
šarplaninac	ŠAR 29	1.036	284
šarplaninac	ŠAR 30	0.981	26.5
šarplaninac	ŠAR 31	1.024	85.5
šarplaninac	ŠAR 32	1.03	103
šarplaninac	ŠAR 33	1.016	62.5
šarplaninac	ŠAR 34	1.017	60
šarplaninac	ŠAR 35	1.13	39
šarplaninac	ŠAR 36	1.113	54
šarplaninac	ŠAR 37	1.135	88
šarplaninac	ŠAR 38	1.011	46
šarplaninac	ŠAR 39	1.089	98
šarplaninac	ŠAR 40	1.225	73.5
šarplaninac	ŠAR 41	1.16	54.5
šarplaninac	ŠAR 42	1.031	49.5
šarplaninac	ŠAR 43	1.177	36.5
šarplaninac	ŠAR 44	1.12	46.5
šarplaninac	ŠAR 45	1.161	72
šarplaninac	ŠAR 46	1.132	43
šarplaninac	ŠAR 47	1.197	39.5
šarplaninac	ŠAR 48	1.195	70.5
šarplaninac	ŠAR 49	1.011	47.5
šarplaninac	ŠAR 50	1	52
šarplaninac	ŠAR 51	1.214	156
šarplaninac	ŠAR 52	1.296	204
šarplaninac	ŠAR 53	1.171	199
šarplaninac	ŠAR 54	1.11	70.5
šarplaninac	ŠAR 55	0.933	90
šarplaninac	ŠAR 56	1.026	59.5
šarplaninac	ŠAR 57	0.95	47.5
šarplaninac	ŠAR 58	1.042	61.5
šarplaninac	ŠAR 59	0.966	100
šarplaninac	ŠAR 60	1.082	85.5
šarplaninac	ŠAR 61	0.992	245

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
šarplaninac	ŠAR 62	0.925	93
šarplaninac	ŠAR 63	0.936	117
šarplaninac	ŠAR 64	1.133	196
šarplaninac	ŠAR 65	1.02	104
šarplaninac	ŠAR 66	0.995	110
šarplaninac	ŠAR 67	0.943	49.5
šarplaninac	ŠAR 68	0.85	73.5
šarplaninac	ŠAR 69	0.959	58
šarplaninac	ŠAR 70	1.075	64.5
šarplaninac	ŠAR 71	0.928	90.5
šarplaninac	ŠAR 72	1.061	165
šarplaninac	ŠAR 73	1.079	89
šarplaninac	ŠAR 74	0.972	87
šarplaninac	ŠAR 75	1.229	118
šarplaninac	ŠAR 76	0.976	82
šarplaninac	ŠAR 77	1.111	5
šarplaninac	ŠAR 78	1.278	11.5
šarplaninac	ŠAR 79	1.216	203
šarplaninac	ŠAR 80	1.063	220
šarplaninac	ŠAR 81	1.304	15
tornjak	TOR 1	1.129	52.5
tornjak	TOR 2	1.096	74.5
tornjak	TOR 3	1.089	73.5
tornjak	TOR 4	1.222	110
tornjak	TOR 5	0.953	70.5
tornjak	TOR 6	1.006	87
tornjak	TOR 7	0.965	82
tornjak	TOR 8	1	94.5
tornjak	TOR 9	0.82	155
tornjak	TOR 10	1.093	88.5
tornjak	TOR 11	1.05	73.5
tornjak	TOR 12	1.305	130
tornjak	TOR 13	1.016	62
tornjak	TOR 14	1.202	59.5
tornjak	TOR 15	1.021	98.5
tornjak	TOR 16	0.879	61.5
tornjak	TOR 17	1.395	103
tornjak	TOR 18	1.2	102
tornjak	TOR 19	1.307	149
tornjak	TOR 20	1.058	100
tornjak	TOR 21	1.012	42.5

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
tornjak	TOR 22	1.09	84.5
tornjak	TOR 23	1.114	93
tornjak	TOR 24	0.884	168
tornjak	TOR 25	0.965	55
tornjak	TOR 26	0.924	85
tornjak	TOR 27	1.096	62.5
tornjak	TOR 28	0.932	68
tornjak	TOR 29	1.295	240
tornjak	TOR 30	1.214	162
tornjak	TOR 31	0.853	174
tornjak	TOR 32	1.269	186
tornjak	TOR 33	0.789	58
tornjak	TOR 34	2.286	8
tornjak	TOR 35	2	24
tornjak	TOR 36	1.857	26
tornjak	TOR 37	1.235	42
tornjak	TOR 38	1.7	8.5
tornjak	TOR 39	1.7	17
tornjak	TOR 40	2.5	5
tornjak	TOR 41	2.1	10.5
tornjak	TOR 42	1.065	245
tornjak	TOR 43	2.5	2.5
tornjak	TOR 44	3	3
tornjak	TOR 45	2.167	6.5
tornjak	TOR 46	2	8
tornjak	TOR 47	1.727	9.5
tornjak	TOR 48	1.818	10
tornjak	TOR 49	3.5	3.5
tornjak	TOR 50	2.25	4.5
tornjak	TOR 51	2	7
tornjak	TOR 52	2.6	6.5
tornjak	TOR 53	2.4	6
tornjak	TOR 54	2	8
tornjak	TOR 55	3.333	5
tornjak	TOR 56	2.333	7
tornjak	TOR 57	1.875	22.5
tornjak	TOR 58	2	11
tornjak	TOR 59	2.25	9
tornjak	TOR 60	2.333	3.5
tornjak	TOR 61	2.333	7
tornjak	TOR 62	1.71	26.5

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
tornjak	TOR 63	2	11
tornjak	TOR 64	2	9
tornjak	TOR 65	1.857	6.5
tornjak	TOR 66	2.2	5.5
tornjak	TOR 67	1.75	3.5
tornjak	TOR 68	1.857	6.5
tornjak	TOR 69	4	2
tornjak	TOR 70	3	4.5
tornjak	TOR 71	3	4.5
tornjak	TOR 72	2.333	3.5
tornjak	TOR 73	2.5	2.5
tornjak	TOR 74	2	6
tornjak	TOR 75	2.111	9.5
tornjak	TOR 76	2.4	6
tornjak	TOR 77	5	2.5
tornjak	TOR 78	4	2
tornjak	TOR 79	2.667	4
tornjak	TOR 80	3	3
tornjak	TOR 81	2.143	15
tornjak	TOR 82	2	6
tornjak	TOR 83	2.667	4
tornjak	TOR 84	----	2
tornjak	TOR 85	5	2.5
tornjak	TOR 86	2.5	2.5
tornjak	TOR 87	5	2.5
tornjak	TOR 88	2.333	3.5
tornjak	TOR 89	5	2.5
tornjak	TOR 90	3.5	3.5
tornjak	TOR 91	6	3
tornjak	TOR 92	1.684	16
tornjak	TOR 93	1.8	13.5
tornjak	TOR 94	1.778	8
tornjak	TOR 95	2.667	4
tornjak	TOR 96	2	6
tornjak	TOR 97	3.333	5
tornjak	TOR 98	4	4
tornjak	TOR 99	2.4	6
tornjak	TOR 100	2.6	6.5
vuk	WCRO 106	2.2	11
vuk	WCRO 109	2.333	7
vuk	WCRO 112	2.167	6.5

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
vuk	WCRO 133	2.111	9.5
tibetski terijer	01 TTLJ	2	13
tibetski terijer	02 TTLJ	2.154	14
tibetski terijer	03 TTLJ	2.167	13
tibetski terijer	04 TTLJ	2	13
tibetski terijer	05 TTLJ	2.6	6.5
tibetski terijer	06 TTLJ	2.167	19.5
tibetski terijer	07 TTLJ	2.571	9
tibetski terijer	08 TTLJ	3	4.5
tibetski terijer	09 TTLJ	2.2	11
tibetski terijer	10 TTLJ	----	2
tibetski terijer	11 TTLJ	3	3
tibetski terijer	12 TTLJ	3	4.5
tibetski terijer	13 TTLJ	2.8	7
tibetski terijer	14 TTLJ	2.75	5.5
tibetski terijer	15 TTLJ	2.167	6.5
tibetski terijer	16 TTLJ	1.556	7
tibetski terijer	17 TTLJ	2.375	9.5
tibetski terijer	TT 01	2.4	6
tibetski terijer	TT 02	3	3
tibetski terijer	TT 03	2	7
tibetski terijer	TT 04	1.875	7.5
tibetski terijer	TT 05	2.625	10.5
tibetski terijer	TT 06	2	3
tibetski terijer	TT 07	2	7
tibetski terijer	TT 08	2.091	11.5
tibetski terijer	TT 09	4	4
tibetski terijer	TT 10	2.667	8
tibetski terijer	TT 11	3.333	5
tibetski terijer	TT 12	4	4
tibetski terijer	TT 13	2.667	4
tibetski terijer	TT 14	2.25	4.5
tibetski terijer	TT 15	3.333	5
tibetski terijer	TT 16	2.8	7
tibetski terijer	TT 17	2.667	4
tibetski terijer	TT 18	2.75	5.5
tibetski terijer	TT 19	-3	1.5
tibetski terijer	TT 20	2.75	5.5
tibetski terijer	TT 21	2.4	6
tibetski terijer	TT 22	-1	0.5
tibetski terijer	TT 23	2.667	4

Tablica 4. Lista uzorkovanih pasa i popratne informacije o čistoći i koncentraciji DNA

Pasmina	Uzorak	Oznaka za čistoću DNA A260/A280	Koncentracija ng/μl
tibetski terijer	TT 24	3	4.5
tibetski terijer	TT 25	6	3
tibetski terijer	TT 26	2.75	5.5
tibetski terijer	TT 27	0	0
tibetski terijer	TT 28	----	3.5
tibetski terijer	TT 29	----	2
tibetski terijer	TT 30	2.385	15.5
tibetski terijer	TT 31	2.429	8.5
tibetski terijer	TT 32	2.176	18.5
tibetski terijer	TT 33	3	9
tibetski terijer	TT 34	1.783	20.5
tibetski terijer	TT 35	2.625	10.5
tibetski terijer	TT 36	----	1.5
tibetski terijer	TT 37	----	2
tibetski terijer	TT 38	3.5	3.5
tibetski terijer	TT 39	2.083	12.5
tibetski terijer	TT 40	2.25	4.5
tibetski terijer	TT 41	2.3	11.5
tibetski terijer	TT 42	----	1.5
tibetski terijer	TT 43	2.214	15.5
tibetski terijer	TT 44	1.813	14.5
tibetski terijer	TT KABA	1.143	16

Tablica 5. Konstruirani haplotipovi CR-a mtDNA pasa prikazani MJ mrežom za set s kraškim ovčarem, šarplanincem i tornjakom

Haplotip	Frekvencija	Fasta radno ime
H1	11	1_Referent_A1a, 87_TOR_A1a, 88_TOR_A1a, 90_TOR_A1a, 96_TOR_A1a, 97_TOR_A1a, 98_TOR_A1a, 146_GSD_A1a, 150_GSD_A1a, 151_GSD_A1a, 161_GSD_A1a
H2	6	2_CROS_B1a, 9_CROS_B1a, 11_CROS_B1a, 17_CROS_B1a, 22_CROS_B1a, 43_IKG_B1a
H3	24	3_CROS_A1a, 4_CROS_A1a, 6_CROS_A1a, 7_CROS_A1a, 8_CROS_A1a, 10_CROS_A1a, 12_CROS_A1a, 13_CROS_A1a, 14_CROS_A1a, 15_CROS_A1a, 16_CROS_A1a, 18_CROS_A1a, 19_CROS_A1a, 20_CROS_A1a, 21_CROS_A1a, 50_MEDI_A1a, 83_POSG_A1a, 121_BSD_A1a, 168_HUSK_A1a, 182_KGL_A1a, 184_KOMO_A1a, 185_KUVZ_A1a, 193_LAB_A1a, 219_TIBM_A1a
H4	8	5_CROS_A12, 109_AKB_A12, 116_BMD_A12, 117_BMD_A12, 118_BMD_A12, 169_KGL_A12, 183_KOMO_A12, 198_LEON_A12
H5	26	23_DALM_A1c, 24_DALM_A1c, 27_DALM_A1c, 30_DALM_A1c, 31_DALM_A1c, 32_DALM_A1c, 34_DALM_A1c, 35_DALM_A1c, 37_DALM_A1c, 39_DALM_A1c, 40_DALM_A1c, 56_MEDI_A1c, 57_MEDI_A1c, 125_CKCS_A1c, 126_CKCS_A1c, 127_CKCS_A1c, 129_CKCS_A1c, 149_GSD_A1c, 152_GSD_A1c, 156_GSD_A1c, 189_LAB_A1c, 191_LAB_A1c, 192_LAB_A1c, 194_LAB_A1c, 206_SAR_A1c, 212_SAR_A1c
H6	4	25_DALM_A1a, 26_DALM_A1a, 33_DALM_A1a, 200_MARM_A1a
H7	15	28_DALM_A1a, 29_DALM_A1a, 42_IKG_A1a, 44_IKG_A1a, 45_IKG_A1a, 81_POSG_A1a, 103_AKB_A1a, 105_AKB_A1a, 110_AKB_A1a, 164_HUSK_A1a, 174_KGL_A1a1, 179_KGL_A1a, 186_KUVZ_A1a, 199_MARM_A1a, 220_TIBM_A1a
H8	2	36_DALM_A1a, 38_DALM_A1a
H9	10	41_IKG_C, 91_TOR_C, 92_TOR_C, 94_TOR_C, 95_TOR_C, 147_GSD_C, 148_GSD_C, 154_GSD_C, 158_GSD_C, 167_HUSK_C
H10	2	46_IOG_B12, 82_POSG_B12

Tablica 5. Konstruirani haplotipovi CR-a mtDNA pasa prikazani MJ mrežom za set s kraškim ovčarem, šarplanincem i tornjakom

Haplotip	Frekvencija	Fasta radno ime
H11	29	47_MEDI_C2, 48_MEDI_C2, 49_MEDI_C2, 51_MEDI_C2, 52_MEDI_C2, 53_MEDI_C2, 54_MEDI_C2, 55_MEDI_C2, 58_MEDI_C2, 60_MEDI_C2, 61_MEDI_C2, 62_MEDI_C2, 63_MEDI_C2, 64_MEDI_C2, 65_MEDI_C2, 67_MEDI_C2, 68_MEDI_C2, 69_MEDI_C2, 70_MEDI_C2, 71_MEDI_C2, 72_MEDI_C2, 73_MEDI_C2, 74_MEDI_C2, 75_MEDI_C2, 76_MEDI_C2, 77_MEDI_C2, 78_MEDI_C2, 79_MEDI_C2, 80_MEDI_C2
H12	1	59_MEDI_B1a
H13	5	66_MEDI_A1c, 170_KGL_A1c, 187_LAB_A1c, 196_LAB_A1c, 197_LAB_A1c
H14	1	84_POSG_A1a
H15	2	85_TOR_A2a, 86_TOR_A2a
H16	2	89_TOR_A2a, 93_TOR_A2a
H17	1	99_WCRO_N1b
H18	1	100_WCRO_J
H19	2	101_WCRO_D4, 102_WCRO_D4
H20	1	104_AKB_A1d
H21	1	106_AKB_A1a
H22	2	107_AKB_A1c, 171_KGL_A1c
H23	1	108_AKB_B1a
H24	8	111_BMD_A1g, 112_BMD_A1g, 113_BMD_A1g, 114_BMD_A1g, 115_BMD_A1g, 119_BMD_A1g, 120_BMD_A1g1, 215_STBRN_A1g1
H25	4	122_CAUC_B1a1, 178_KGL_B1a, 208_SAR_B1a, 210_SAR_B1a
H26	2	123_CKCS_A1a, 128_CKCS_A1a
H27	1	124_CKCS_A1a
H28	3	130_COLL_A1d, 132_DOPB_A1d, 134_DOPB_A1d
H29	1	131_CSD_A1d
H30	2	133_DOPB_C1b, 138_DOPB_C1b

Tablica 5. Konstruirani haplotipovi CR-a mtDNA pasa prikazani MJ mrežom za set s kraškim ovčarem, šarplanincem i tornjakom

H31	14	135_DOPB_B12, 136_DOPB_B12, 137_DOPB_B12, 139_GPYR_B12, 140_GPYR_B12, 143_GPYR_B12, 160_GSD_B12, 173_KGL_B12, 175_KGL_B12, 176_KGL_B12, 188_LAB_B12, 190_LAB_B12, 201_MARM_B12, 214_STBRN_B12
H32	3	141_GPYR_A1f, 144_GPYR_A1f, 145_GPYR_A1f
H33	1	142_GPYR_A1a
H34	1	153_GSD_C1b
H35	1	155_GSD_A4a
H36	1	157_GSD_A1i
H37	1	159_GSD_A1c
H38	1	162_GSM_A
H39	1	163_GSM_A1c
H40	2	165_HUSK_A2, 166_HUSK_A2
H41	6	172_KGL_C1a, 181_KGL_C1a, 204_SAR_C1a, 205_SAR_C1a, 207_SAR_C1a, 209_SAR_C1a
H42	1	177_KGL_B2a
H43	1	180_KGL_B12
H44	1	195_LAB_A1c
H45	1	202_MARM_A1a
H46	3	203_MARM_A1a, 211_SAR_A1a, 213_SAR_A1a
H47	2	216_TIBM_A6a, 217_TIBM_A6a
H48	1	218_TIBM_A2b
H49	1	221_TIBM_A2a
H50	1	222_TIBM_A2b
H51	1	223_TIBM_A2b
H52	1	224_TIBM_A1a

Tablica 6. Konstruirani haplotipovi CR-a mtDNA pasa prikazani MJ mrežom za set s tibetskim terijerom

Haplotip	Frekvencija	Fasta radno ime
H1	3	1_Referent_A1a, 108_JRT_A1a, 147_SHI_A1a
H2	18	2_TTF1_A1a, 3_TTF1_A1a, 37_TTNA_A1a, 39_TTNA_A1a1, 40_TTNA_A1a1, 42_TTNA_A1a1, 43_TTNA_A1a1, 93_FOXT_A1a, 95_JRT_A1a, 99_JRT_A1a, 104_JRT_A1a, 110_JRT_A1a, 111_JRT_A1a, 116_LHAP_A1a, 118_LHAP_A1a, 119_LHAP_A1a, 127_PRT_A1a, 144_SHI_A1a
H3	21	4_TTF1_A1i, 5_TTF1_A1i, 6_TTF1_A1i, 8_TTF2_A1i, 9_TTF2_A1i, 10_TTF2_A1i, 11_TTF2_A1i, 12_TTF2_A1i, 14_TTF3_A1i, 15_TTF3_A1i, 17_TTLA_A1i, 18_TTLA_A1i, 22_TTLA_A1i, 25_TTLA_A1i, 30_TTLA_A1i, 31_TTLA_A1i, 32_TTLA_A1i, 33_TTLA_A1i, 35_TTLU_A1i, 36_TTLU_A1i, 100_JRT_A1i
H4	12	7_TTF1_A1g, 13_TTF2_A1g1, 16_TTF3_A1g, 19_TTLA_A1g, 20_TTLA_A1g, 23_TTLA_A1g, 24_TTLA_A1g, 26_TTLA_A1g, 27_TTLA_A1g, 28_TTLA_A1g, 29_TTLA_A1g, 34_TTLA_A1g
H5	39	21_TTLA_B12, 38_TTNA_B12, 41_TTNA_B12, 44_TTNA_B12, 45_TTNA_B12, 46_TTNA_B12, 47_TTNA_B12, 48_TTNA_B12, 53_AIR_B12, 55_AIR_B12, 56_AIR_B12, 68_AST_B12, 71_AUST_B12, 78_BOST_B12, 89_CT_B12, 90_CT_B12, 92_FOXT_B12, 105_JRT_B12, 107_JRT_B12, 113_KBT_B12, 114_KBT_B12, 120_LHAP_B12, 121_LHAP_B1a, 128_RATT_B12, 139_SHI_B12, 140_SHI_B12, 141_SHI_B12, 142_SHI_B12, 145_SHI_B12, 152_TIBS_B12, 153_TTEU_B12, 157_WHWT_B12, 160_WHWT_B12, 163_WHWT_B1a, 166_YOR_B12, 167_YOR_B12, 169_YOR_B12, 173_YOR_B12, 174_YOR_B12
H6	1	49_WCRO_N1b
H7	1	50_WCRO_J
H8	2	51_WCRO_D4, 52_WCRO_D4
H9	14	54_AIR_A1a, 64_APB_A1a, 67_AST_A1a, 73_BOST_A1a, 82_CT_A1a, 96_JRT_A1a, 101_JRT_A1a, 106_JRT_A1a, 122_MANT_A1a, 123_MANT_A1a, 132_SBT_A1a, 146_SHI_A1a, 171_YOR_A1a, 172_YOR_A1a

Tablica 6. Konstruirani haplotipovi CR-a mtDNA pasa prikazani MJ mrežom za set s tibetskim terijerom

Haplotip	Frekvencija	Fasta radno ime
H10	22	57_AIR_A1c, 60_APB_A1c, 63_APB_A1c, 65_APB_A1c, 66_AST_A1c, 70_AST_A1c, 75_BOST_A1c, 76_BOST_A1c, 77_BOST_A1c, 80_BullT_A1c, 81_BullT_A1c, 97_JRT_A1c, 98_JRT_A1c, 102_JRT_A1c, 112_JRT_A1c, 124_PBT_A1c, 125_PBT_A1c, 129_SBT_A1c, 131_SBT_A1c, 150_TFT_A1c, 164_WHWT_A1c, 175_YOR_A1c
H11	3	58_APB_C2, 79_BRT_C2, 109_JRT_C2
H12	2	59_APB_C1b, 126_PBT_C1b
H13	9	61_APB_A12, 85_CT_A12, 86_CT_A12, 87_CT_A12, 94_IT_A12, 133_SCT_A12, 134_SCT_A12, 154_WHWT_A12, 156_WHWT_A12
H14	2	62_APB_A1a, 117_LHAP_A1a
H15	2	69_AST_B1a, 148_SHI_B1a
H16	1	72_BOST_C
H17	6	74_BOST_C, 115_LHAP_C, 161_WHWT_C, 162_WHWT_C, 165_WHWT_C, 170_YOR_C
H18	7	83_CT_A1a, 84_CT_A1a, 91_CT_A1a, 135_SCWT_A1a, 136_SCWT_A1a, 137_SCWT_A1a, 159_WHWT_A1a
H19	2	88_CT_A1a, 155_WHWT_A1a
H20	1	103_JRT_C2
H21	1	130_SBT_A1c
H22	1	138_SHI_B1a
H23	1	143_SHI_A4a
H24	1	149_SHI_B12
H25	1	151_TIBS_B1a
H26	1	158_WHWT_A12
H27	1	168_YOR_A1c
H28	1	176_YOR_A1a