

Genomska karakterizacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Držaić, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:204:369362>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Ivana Držaić

GENOMSKA KARAKTERIZACIJA HRVATSKIH IZVORNIH PASMINA OVACA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Ivana Držaić

GENOMSKA KARAKTERIZACIJA HRVATSKIH IZVORNIH PASMINA OVACA

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof.dr.sc. Vlatka Čubrić Čurik

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Agriculture

Ivana Držaić

GENOMIC CHARACTERIZATION OF THE CROATIAN AUTOCHTHONOUS SHEEP BREEDS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: prof.dr.sc. Vlatka Čubrić Čurik

Zagreb, 2022.

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: prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik
- Broj stranica: 108
- Broj slika: 30
- Broj tablica: 5
- Broj grafova: 8
- Broj priloga: 11
- Broj literaturnih referenci: 151

Datum obrane doktorskog rada: 15.06.2022.

Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:

1. prof. dr.sc. Ino Čurik

redoviti profesor u trajnom zvanju, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. doc.dr.sc. Vladimir Brajković

docent Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

3. doc.dr.sc. Boris Lukić

docent Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p. 550, 10 000 Zagreb

Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog Fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 03.12.2019, te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 10.03.2020.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, **Ivana Držaić**, izjavljujem da sam samostalno izradila doktorski rad pod naslovom:

GENOMSKA KARAKTERIZACIJA HRVATSKIH IZVORNIH PASMINA OVACA

Svojim potpisom jamčim:

- Da sam jedina autorica ovog 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, 15.06.2022. godine

Ivana Držaić

Ocjena doktorskog rada

Doktorski rad je ocijenilo povjerenstvo u sastavu:

1. prof. dr.sc. Ino Čurik

redoviti profesor u trajnom zvanju, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. doc.dr.sc. Vladimir Brajković

docent Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

3. doc.dr.sc. Boris Lukić

docent Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku

Doktorski rad obranjen je na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, dana 15.06.2022. pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr.sc. Ino Čurik

redoviti profesor u trajnom zvanju, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. doc.dr.sc. Vladimir Brajković

docent Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

3. doc.dr.sc. Boris Lukić

docent Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku

Informacije o mentorici

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 nagradom, Dekanovom nagradom i Nagradom društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu. Magistrirala je 2005. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Doktorat znanosti stekla je 2009. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Kao mentor uspješno vodi tri doktorata. Od 2022. godine je redoviti 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 (34 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, Evolutionary Applications, Trends in Ecology and Evolution, itd.). Receptent 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 (Twining: Spreading excellence and Widening Participation) bio najbolje rangirani projekt od ukupno 546 prihvaćenih projekata. Suradnik je u nekoliko EU projekata. Od 2018. – 2023. voditelj je HRZZ projekta ANAGRAMS (Primjena NGS metoda u procjeni genomske varijabilnosti preživača, IP-2018-01-8708). Operativno je vodila izgradnju arheogenetičkog laboratorija Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu čija je izgradnja završila 30.04.2021 godine, te je voditeljica Laboratorija za arheogenetiku Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvala

Želim iskazati veliku zahvalnost mentorici, prof.dr.sc. Vlatki Čubrić Čurik, na konstruktivnim savjetima, idejama, stručnom i tehničkom vodstvu tijekom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Ini Čuriku na velikom broju korisnih savjeta i smjernica koje su mi pomogle u pisanju disertacije.

Zahvaljujem kolegi doc.dr.sc. Vladimiru Brajkoviću na uvijek dostupnoj pomoći i prijateljskom savjetu u svakoj prilici.

Doc.dr.sc. Maji Ferenčaković i Mariju Shihabiju, mag.ing.agr želim iskazati zahvalnost za pomoć vezanim uz izračunavanje ROH-ova.

Zahvaljujem Vesni Orehovački, mag.ing.agr i Banci Gena domaćih životinja na susretljivosti prilikom skupljanja uzoraka.

Veliko hvala mojoj obitelji, ponajprije djeci Gabrijelu, Mateju i Emanuelu koji mi svaki dan izmame osmijeh na lice. Hvala mom mužu Valentinu na razumijevanju i velikoj podršci tijekom svih izazova doktorskog studija. Posebno hvala mojoj mami koja me je odgojila da budem uporna i savjesna, te koja je preuzela veliki dio brige za moju obitelj tijekom izrade disertacije.

Također, zahvaljujem svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ove disertacije.

Ivana Držaić

Sažetak

Svakim danom izumire sve veći broj životinja i nepovratno se gubi genetska raznolikost. Selekcijom na određena svojstva (povećanje proizvodnje, kvaliteta vune) životinje gube određenu razinu varijabilnosti. Izvorne pasmine su većinom nisko proizvodne životinje koje su prilagođene specifičnim uvjetima okoliša, te kao takve u pravilu imaju veću genetsku raznolikost. Hrvatske izvorne pasmine ovaca su otporne i izdržljive pasmine, s niskim proizvodnim svojstvima, ali prilagođene na oštre uvjete držanja. Sve izvorne pasmine ovaca spadaju u pramenka tip ili su nastale na osnovi pramenka tipa. U Hrvatskoj je priznato devet izvornih pasmina ovaca, a ovim doktorskim radom je obuhvaćeno njih osam: istarska ovca, creska ovca, krčka ovca, paška ovca, rapska ovca, dalmatinska pramenka, lička pramenka, i dubrovačka ovca. Osim hrvatskih izvornih pasmina ovaca u rad je uključeno 10 muflona iz Kalifronta te 21 javno dostupna europska pasmina s područja Mediterana ili istočne Europe. Ciljevi ovog doktorskog rada bili su utvrditi konzervacijski status hrvatskih izvornih pasmina ovaca, odrediti jedinstvenost genoma hrvatskih izvornih pasmina ovaca i pozicionirati hrvatske izvorne pasmine ovaca u mediteranski kontekst na temelju genotipskih podataka dobivenih s Infinium Ovine HD® SNP čipom koji sadržava 606 000 polimorfni mjesta. Sve jedinke hrvatskih izvornih pasmina ovaca uspješno su genotipizirane visokorezolutnim SNP čipom te su pokazale visoku genetsku raznolikost. Analizom unutar i između populacijskih odnosa hrvatskih izvornih pasmina utvrđeno je da se pasmine dijele na otočke i kontinentalne obzirom na geografske barijere (more i planine). U otočke pasmine svrstale su se istarska ovca, krčka ovca, creska ovca, rapska ovca i paška ovca, dok su se u kontinentalne pasmine grupirale lička pramenka i dalmatinska pramenka te dubrovačka ovca. Ovakvu podjelu populacija pokazale su analize glavnih komponenti, Structure analiza, analiza Nei genetskih udaljenosti prikazana Neighbour Net mrežom kao i filogenetsko stablo dobiveno SplitsTree softverom. Structure analiza je dodatno pokazala veliku sličnost paške i rapske ovca kao i lička i dalmatinske pramenke. Hrvatske izvorne pasmine pokazale su nisku do srednju razinu genomskog inbridnga ($F_{ROH>2Mb} = 0,025 - 0,056$), jedino je kod dubrovačke ovce utvrđena nešto viša razina inbridnga od 0,070. Kod dalmatinske i ličke pramenke te paške ovce utvrđena je visoka efektivna veličina populacije, dok je najmanja efektivna veličina populacije utvrđena kod krčke ovce. Gledano u širem mediteranskom kontekstu hrvatske izvorne pasmine ovaca grupirale su se zajedno s ostalim ovcama pramenka tipa i smjestile između istočno i zapadnoeuropskih ovaca. Uspoređujući hrvatske izvorne ovce s europskim pasminama utvrđeno je osam genomskih regija specifičnih za hrvatske izvorne pasmine.

Ključne riječi: genomski raznolikost, izvorne pasmine ovaca, konzervacijski status, struktura populacije

Expanded summary

Every day we witness the reduction of genetic variability of plants and animals. The extinction of animals is a process that is constantly taking place, and the loss of genetic material is inevitable. As we intensify selection for higher production, we reduce the genetic variability of these species. Autochthonous animals are usually lower production animals raised in extensive systems and are better adapted to environmental conditions and therefore have higher genetic variability. Sheep breeding has historically been an important part of agricultural production on Croatian territory. It is believed that sheep came to Croatia with human migrations in the Neolithic period and are an integral part of Croatian culture since. In the 18th century, Dalmatia had the highest number of sheep in Europe. Since then, the number of sheep has steadily decreased and some of the Croatian sheep breeds are threatened with extinction. The Croatian autochthonous sheep breeds are low production animals adapted to harsh environmental conditions and extensive breeding systems. They all belong to the Pramenka sheep type or are descended from the Pramenka sheep type. There are nine recognised autochthonous sheep breeds in Croatia and eight of them are discussed in this doctoral thesis: Istrian sheep, Cres Island sheep, Krk Island sheep, Pag Island sheep, Rab Island sheep, Dalmatian Pramenka, Lika Pramenka and Dubrovnik sheep -ruda. Another 21 European sheep breeds from the Data repository were included in this analysis as well as ten mouflon samples from Kalifront. This PhD aimed to estimate the conservation status of Croatian autochthonous sheep breeds, determine the unique parts of the genome and position Croatian autochthonous sheep breeds in the Mediterranean context. For this purpose, the high-density Infinium Ovine HD SNP chip was used, which contains 606 000 polymorphic positions. All Croatian autochthonous sheep breeds were successfully genotyped. Croatian autochthonous sheep breeds showed high genetic diversity. Based on the analysis within and between populations, it is clear that Croatian autochthonous sheep breeds are divided into two groups based on their geographical characteristics: island breeds and continental breeds. Island breeds include Istrian sheep, Krk Island sheep, Cres Island sheep, Rab Island sheep and Pag Island sheep, while continental breeds include Lika Pramenka, Dalmatian Pramenka and Dubrovnik sheep. This clustering was confirmed with PCA, Structure analysis, Nei distances represented with Neighbour Net network and phylogenetic analysis performed with SplitsTree. Furthermore, the Structure analysis showed that not all breeds are completely separated. The Pag Island sheep and the Rab Island sheep, as well as the Lika Pramenka and the Dalmatian Pramenka, showed similar ancestral breed composition, indicating greater genetic relatedness. The Croatian autochthonous sheep breeds showed a lower degree of genomic inbreeding obtained from runs of homozygosity. The highest inbreeding was observed in

Dubrovnik sheep with $F_{ROH} > 2Mb = 0.07$. Higher recent inbreeding (up to 5 generations ago) was observed in all breeds. The lowest effective population size was observed in sheep from the island of Krk (61), but lower N_e was also observed in sheep from the island of Cres (148), Dubrovnik sheep (157) and Istrian sheep (161). The highest effective population size was observed in Dalmatian Pramenka sheep (1039). The Croatian autochthonous sheep breeds observed in the Mediterranean context grouped with other European Pramenka sheep types. In the PCA diagram, they were placed in the middle of the diagram, creating a link between Eastern European and Western European sheep breeds. The Croatian autochthonous sheep breeds had eight specific genomic regions compared to the European breeds. Since some of the Croatian autochthonous sheep breeds have lower effective population size and higher inbreeding, additional caution should be taken when implementing breeding programmes.

Keywords: autochthonous sheep breeds, conservation status, genomic diversity, population structure

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Hipoteze i ciljevi	2
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	3
2.1. Upotreba molekularnih markera u genomskoj karakterizaciji ovaca	3
2.1.1. Mikrosateliti	3
2.1.2. Mitohondrijska DNA.....	4
2.1.3. Y kromosom	5
2.1.4. Polimorfizam jednog nukleotida (SNP - engl. <i>Single nucleotide polymorphism</i>)	6
2.1.4.1. Stvaranje SNP čipa	6
2.1.4.2. Primjena SNP čipa	8
2.2. Konzervacijska genetika	8
2.2.1. Inbriding.....	8
2.2.2. Efektivna veličina populacije.....	9
2.3. Dosadašnja genetska istraživanja hrvatskih izvornih pasmina ovaca	10
2.4. Domestikacija ovaca	13
2.5. Ovčarstvo u Hrvatskoj.....	13
2.6. Pasmine ovaca.....	14
2.6.1. Pramenka	14
2.6.2. Krčka ovca	15
2.6.3. Rapska ovca.....	16
2.6.4. Creska ovca	17
2.6.5. Paška ovca.....	18
2.6.6. Istarska ovca.....	19
2.6.7. Lička pramenka	20
2.6.8. Dalmatinska pramenka	21
2.6.9. Dubrovačka ovca – ruda.....	22
2.6.10. Europski muflon (<i>Ovis musimon</i>)	23
3. MATERIJALI I METODE	24
3.1. Biološki materijal.....	24
3.2. Dodatni uzorci	26
3.3. Ekstrakcija DNA	26
3.3.1. Postupak ekstrakcije DNA iz krvi.....	27
3.3.2. Postupak ekstrakcije DNA iz tkiva	27
3.4. Provjera kvalitete i kvantitete DNA	28
3.5. Određivanje genotipova i kontrola kvalitete.....	30
3.6. Genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina ovaca	30
3.7. Analiza strukture hrvatskih izvornih pasmina ovaca.....	31
3.8. Procjena konzervacijskog statusa hrvatskih izvornih pasmina ovaca	32
4. REZULTATI	34
4.1. Kvaliteta i čistoća DNA.....	34

4.2.	Genotipizacija i kontrola kvalitete	34
4.3.	Genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina ovaca	34
4.4.	Multivarijatne analize	36
4.4.1.	Analiza glavnih komponenti (PCA)	36
4.4.2.	Analiza strukture populacije	38
4.5.	Filogenetski odnosi hrvatskih izvornih pasmina ovaca	42
4.5.1.	Nei genetske distance prikazane Neighbour – Net mrežom.....	42
4.5.2.	Filogenetsko stablo	45
4.6.	Konzervacijski status hrvatskih izvornih pasmina ovaca	50
4.6.1.	Genomski inbriding hrvatskih izvornih pasmina ovaca.....	50
4.6.2.	Efektivna veličina populacije hrvatskih izvornih pasmina ovaca	51
5.	RASPRAVA	54
5.1.	Genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina ovaca	54
5.2.	Analiza glavnih komponenti hrvatskih izvornih pasmina ovaca	55
5.3.	Analiza strukture populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca	57
5.4.	Analiza genetskih udaljenosti hrvatskih izvornih pasmina ovaca	59
5.5.	Filogenetska analiza hrvatskih izvornih pasmina ovaca	60
5.6.	Genomski inbriding hrvatskih izvornih pasmina ovaca	62
5.7.	Efektivna veličina populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca	64
6.	ZAKLJUČCI.....	67
7.	LITERATURA.....	69
8.	ŽIVOTOPIS	83
9.	PRILOZI.....	85

Popis kratica

Kratica	Opis
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
Δf	stopa inbridinga
F	koeficijent inbridinga
F _{IS}	Wright – Fisherov koeficijent inbridinga
F _{ROH}	genomski inbriding izračunat preko ROH-ova
F _{ST}	fiksacijski indeks
H _o	opažena heterozigotnost
H _e	očekivana heterozigotnost
IBD	engl. identical by descent – jednaki po porijeklu
ISGC	International Sheep and Goat consortium
LD	engl. linkage disequilibrium – neravnoteža vezanosti gena
K	broj pretpostavljenih populacija u structure analizi
Kb	kilo baza
kg	kilogram
N _e	efektivna veličina populacija
ng	nanogram
Mb	mega baza
min	minuta
mL	mililitar
mRNA	engl. messenger RNA – glasnička RNA
mtDNA	mitohondrijska DNA
MTNR1A	melatonin receptor 1 A
MSY	engl. male specific region on Y chromosome – muška specifična regija na Y kromosomu
PCA	engl. principal component analysis – analiza glavnih komponenti
PrP	proteaza rezistentni protein
ROH	engl. runs of homozygosity - homozigotne regije genoma
rpm	engl. rotation per minute – okretaja u minuti

s	sekunda
SE	standardna greška
SNP	engl. single nucleotide polymorphism – polimorfizam jednog nukleotida
SRY	engl. sex – determining region Y gene - gen regija koja određuje spol
V	volt
μl	mikrolitar
μm	mikrometar
°C	stupnjeva Celzijusa

Popis tablica

Tablica 1. Broj uzoraka i lokacija po pasmini.....	24
Tablica 2. Uvjeti za određivanje ROH-ova prema kategorijama	32
Tablica 3. Genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina ovaca	35
Tablica 4. F_{ST} vrijednosti između hrvatskih autohtonih ovaca.....	35
Tablica 5. Efektivna veličina populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca procijenjena GONE i SNeP softverom.....	51

Popis slika

Slika 1. Pikogramski prikaz mikrosatelitnog markera; izvor: Louhichi i sur. (2010)	3
Slika 2. Mithondrijska DNA; izvor: International Society of Genetic Genealogy (https://isogg.org/wiki/Mitochondrial_DNA ; pristup: 28.02.2022.)	4
Slika 3. Y kromosom; izvor: Gusmao i sur. (2008)	5
Slika 4. SNP čip; izvor: Illumina (https://emea.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/ovine-snp50.html ; pristup: 01.03.2022.)	7
Slika 5. Mjesto domestikacije i put širenja ovaca iz područja Plodnog polumjeseca; izvor: Zeder, 2008.....	13
Slika 6. Krčka ovca	15
Slika 7. Rapska ovca	16
Slika 8. Creska ovca	17
Slika 9. Paška ovca	18
Slika 10. Istarska ovca	19
Slika 11. Lička pramenka; izvor: Brajković V.	20
Slika 12. Dalmatinska pramenka	21
Slika 13. Dubrovačka ovca – ruda; izvor: Hrvatski savez uzgajivača ovaca i koza (http://www.ovce-koze.hr/ovcarstvo-kozarstvo/ovcarstvo-i-kozarstvo-u-rh/ovcarstvo-i-kozarstvo-u-rh/pasmine-ovaca/dubrovacka-ovca-ruda/ ; pristup: 25.02.2022.)	22
Slika 14. Muflon; izvor: Rab Archeological Traces (https://morski.hr/2020/06/08/rab-muzej-na-otvorenom-i-40-km-staza-kroz-netaknutu-prirodu/ ; pristup: 25.02.2022)	23
Slika 15. Sustav za uzimanje uzoraka tkiva uha životinje	25
Slika 16. Karta mjesta uzorkovanja hrvatskih izvornih pasmina ovaca	25
Slika 17. Sadržaj kita za izolaciju DNA iz krvi i tkiva.....	26
Slika 18. Sustav za gel elektroforezu	28
Slika 19. Uređaj za snimanje gela UVitech explorer Version 15.01	29
Slika 20. NanoPhotometer P330 Spektrofotometer	29
Slika 21. Grafički prikaz rezultata STRUCTURE analize za hrvatske izvorne pasmine ovaca.	39
Slika 22. Grafički prikaz rezultata STRUCTURE analize za europski set. Prikazani su rezultati za K= 2, 4, 6 i 11.....	41
Slika 23. Nei distance hrvatskih izvornih pasmina ovaca prikazane Neighbour – Net mrežom pomoću SplitsTree softvera	42
Slika 24. Nei distance predstavljene Median-Joining mrežom u Splitstree programu s opcijom povećala.	44

Slika 25. Stablo maksimalne vjerojatnosti hrvatskih izvornih pasmina.....	45
Slika 26. Heat map ostataka stabla maksimalne vjerojatnosti hrvatskih izvornih pasmina ovaca	46
Slika 27. Stablo maksimalne vjerojatnosti hrvatskih izvornih pasmina ovaca s jednom migracijom.....	47
Slika 28. Stablo maksimalne vjerojatnosti prikazano za europski set podataka.....	48
Slika 29. Neighbour-Joining stablo sa sedam migracija za europski set podataka	49
Slika 30. Genomski inbriding hrvatskih autohtonih pasmina ovaca i četiri europske pasmine.	50

Popis grafova

Graf 1. Manhattan plot F_{ST} vrijednosti izračunate za svaki SNP između metapopulacije hrvatskih izvornih pasmina ovaca i europskih pasmina ovaca	36
Graf 2. Analiza glavnih komponenti (PCA) hrvatskog seta podataka.....	37
Graf 3. Analiza glavnih komponenti za europski set podataka	38
Graf 4. Grafički prikaz delta K vrijednosti za hrvatski set podataka	38
Graf 5. Grafički prikaz delta K vrijednosti za populacije europskog seta podataka	40
Graf 6. Prikaz optimalnog broja migracija za europski set podataka	48
Graf 7. Povijesna efektivna veličina populacije dobivena GONE softverom	52
Graf 8. Povijesna efektivna veličina hrvatskih izvornih pasmina dobivena SNeP softverom	53

1. UVOD

Ovca (*Ovis aries*) je domesticirana prije 10 000 – 9 500 godina na području plodnog polumjeseca (Hiendleder i sur., 1998; Zeder, 2008). Svojim karakteristikama male tjelesne mase, visoke otpornosti te niskih hranidbenih potreba omogućeno joj je migriranje s ljudima kojima je služila kao izvor hrane i odjeće. Smatra se da je migracija iz domestikacijskog centra krenula u tri glavna smjera: prema Aziji, Africi i Europi. Arheološki nalazi upućuju na to da je ovca teritorij Hrvatske naselila prije 8 000 – 7 000 godina, te odavde nastavila dalje osvajati područje Srednje i Zapadne Europe (Zeder, 2008). Tijekom migracija ovca je bila izložena prirodnoj selekciji pod utjecajem različitih uvjeta okoliša (temperatura, vlažnost, nadmorska visina), te bolesti i nametnika gdje su samo najprilagodljivije jedinke uspjele preživjeti. Prilagodbom na nove uvjete ovce su mijenjale svoje genotipske karakteristike, a posljedično tome i svoj fenotip. U 18. stoljeću uvodi se pojam pasmine kao rezultat selekcijskog utjecaja čovjeka. Ovce se specijaliziraju prema proizvodnim svojstvima (meso, mlijeko, vuna) što uvjetuje stvaranje čistih pasmina s jedinstvenim genotipom. Danas je poznato da postoji preko 1 500 pasmina ovaca diljem svijeta (FAO, 2015). Iako postoji veliki broj pasmina ovaca što upućuje na visoku genetsku raznolikost znatan broj tih pasmina je ugrožen ili pred izumiranjem. Čak 350 pasmina ovaca je izumrlo ili je ugroženo, a za 800 pasmina status je nepoznat. Hrvatska ima devet izvornih pasmina ovaca od kojih su prema FAO klasifikaciji tri pasmine (krčka ovca, rapska ovca i creska ovca) potencijalno ugrožene, a dvije pasmine (istarska ovca i dubrovačka ovca) ugrožene. Hrvatske izvorne pasmine ovaca uzgajaju se na geografski različitim područjima od niskih do visokih planinskih predjela i svaka je prilagođena na specifične mikroklimatske uvjete svog uzgojnog područja.

Očuvanje bioraznolikosti domaćih životinja naša je obaveza kako bi osigurali dovoljnu genetsku raznolikost potrebnu za suočavanje s budućim izazovima koji uključuju dostupnost i sigurnost hrane te klimatske promjene (Groeneveld i sur., 2010). Izvorne pasmine ovaca u pravilu imaju manju proizvodnju, ali su bolje prilagođene uvjetima okoliša i vjerojatno imaju veću otpornost na bolesti. Te karakteristike čine ih važnim izvorom genetske raznolikosti. Proučavajući rijetke i izvorne pasmine dobivamo priliku otkriti genetske varijacije i procese koji im omogućavaju preživljavanje u specifičnim lokalnim uvjetima okoliša (Beynon i sur., 2015). Razumijevanje genetske strukture i porijekla pasmine neophodno je za uspješnu selekciju i zaštitu pasmina od izumiranja (Kawecka i sur., 2016). Jedan od načina procjene genetske raznolikosti je upotreba molekularnih markera. Molekularni markeri omogućuju procjenu genetske varijabilnosti svake jedinke te određivanje genetskih odnosa između populacija i pasmina (Lenstra i sur., 2012). Danas, najvažniji molekularni marker je SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*), polimorfizam jednog nukleotida. Jedan SNP čip može imati i do 800 000 SNP-ova raspoređenih po

cijelom genomu (Illumina Bovine 800K SNP chip), a male promjene u SNP-ovima mogu imati visoko vrijednu informaciju u analizi strukture populacije (Lao i sur., 2006, Gurgul i sur., 2013) što ih čini iznimno informativnim i vrijednim markerima. Pomoću SNP-ova se mogu procijeniti uzgojne vrijednosti, odnosi unutar i između populacija te odrediti genetske specifičnosti jedinki i populacija. Informacije dobivene pomoću SNP-ova se mogu primijeniti prilikom formiranja uzgojnih programa, konzervacijskih planova i općenito očuvanja pasmina i vrsta.

1.1. Hipoteze i ciljevi

Hipoteze ovog rada su:

- Pojedine hrvatske izvorne populacije ovaca genetski su ugrožene jer imaju visoku razinu inbridinga te malu efektivnu veličinu populacije.
- Postoji razlika između otočkih (paška ovca, creska ovca, rapska ovca, krčka ovca) i kontinentalnih (istarska ovca, dubrovačka ovca, dalmatinska pramenka, lička pramenka) pasmina ovaca.
- Izvorne hrvatske populacije ovaca čine zasebnu grupu zajedno s ostalim ovcama jugoistočne Europe u tipu pramenke.
- U hrvatskim izvornim populacijama ovaca postoji varijabilnost genoma koja je jedinstvena (posljedica selekcije i lokalne adaptacije).

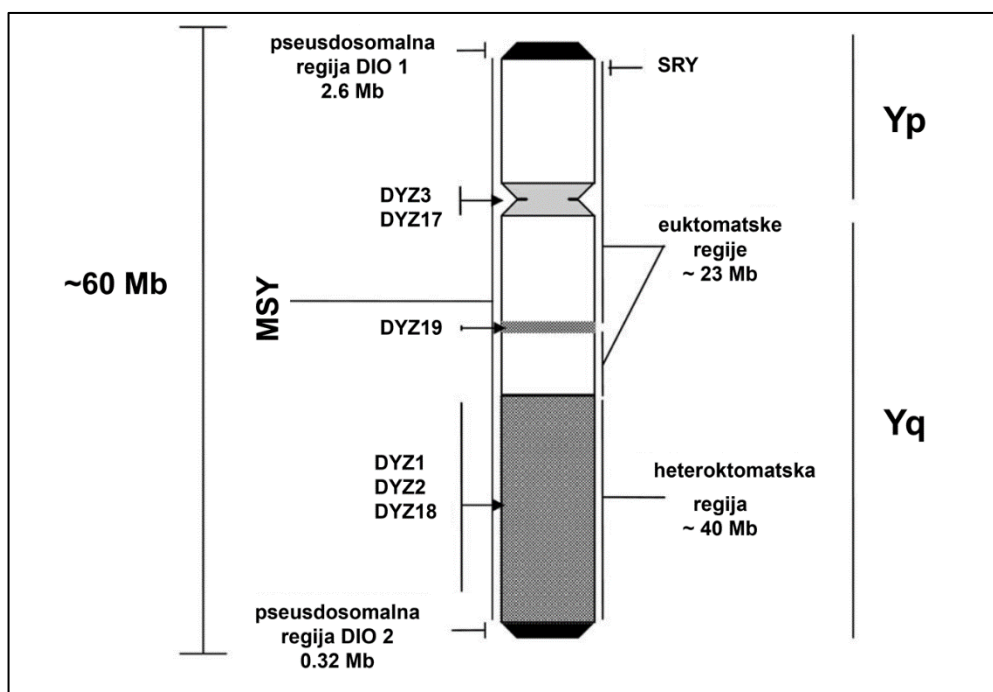
Ciljevi ovog rada su:

- Genotipizirati hrvatske izvorne populacije ovaca visoko rezolutnim SNP čipom.
- Pozicionirati hrvatske izvorne populacije ovaca u odnosu na svjetske populacije.
- Procijeniti konzervacijski status (inbriding i efektivnu veličinu populacije) pojedinih hrvatskih izvornih pasmina ovaca.
- Odrediti jedinstvenu varijabilnost genoma pojedinih hrvatskih izvornih pasmina ovaca.

Mitohondrijska DNA se koristi za određivanje genetske povijesti vrste (Bollongino i sur., 2012), identificiranje regija domestikacije (Naderi i sur., 2008) i rekonstruiranja migracijskih puteva (Groeneveld i sur., 2010; Lenstra i sur., 2012). Specifična je po tome što se nasljeđuje samo od majke, nema rekombinacija i ima visoku stopu mutacija. Osim toga mitohondriji se nalaze u velikom broju u gotovo svim stanicama tijela stoga je njezina dostupnost puno veća od dostupnosti jezgrine DNA. Neki od nedostataka mtDNA su da ne pruža informacije o fenotipu, lokusima pod selekcijom i protoku gena između populacija. Do danas je otkriveno pet filogenetski različitih mtDNA grupa ovaca. Haplogrupe A i B predstavljene su u većini pasmina modernih ovaca s tim da haplogrupa A prevladava na području Azije, a haplogrupa B na području Europe. Ostale haplogrupe su specifične za određena geografska područja, pa tako je haplogrupa C zastupljena u Kini, Turskoj, Bliskom Istoku i Portugalu, a haplogrupe D i E na sjevernom Kavkazu i Turskoj (Meadows i sur., 2007; Tapio i sur., 2006).

2.1.3. Y kromosom

Slično kao što se mitohondrijska DNA nasljeđuje po majčinoj strani tako se varijacije na Y kromosomu prenose očevom linijom. Y kromosom je odličan marker za praćenje introgresije muških jedinki (Edwards i sur., 2011). Dvije vrlo bitne osobine Y kromosoma su da nema rekombinacije na MSY (engl. *male specific region on Y chromosome*) regiji tijekom mejoze i da se nasljeđuje samo po muškoj liniji, slika 3.



Slika 3. Y kromosom; izvor: Gusmao i sur. (2008)

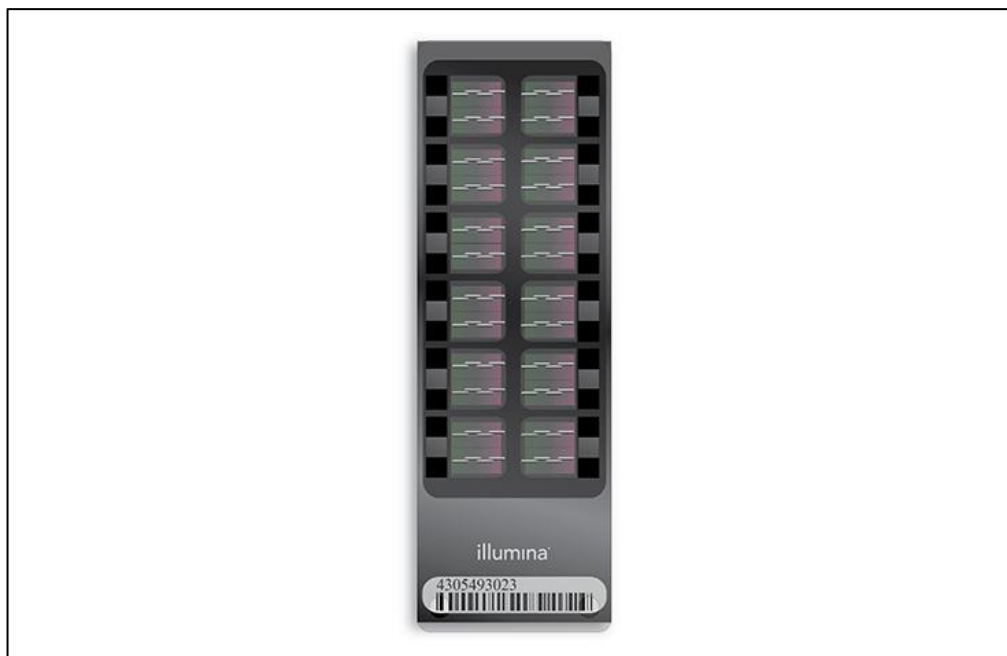
Istraživanja Y kromosoma obuhvaćaju proučavanje dvije regije: gen regije koja određuje spol (SRY, engl. sex-determining region Y gene) i mikrosatelit SRYM18. Identificirana su dva SRY alela (A-oY1, G-oY1). Visoki udio A-oY1 alela (71,4%), koji je karakterističan za divlje srodnike ovaca (*O. canadensis*, *O. dalli*, *O. musimon*), pronađen je kod 65 istraživanih svjetskih pasmina. Najveći udio G-oY1 alela je pronađen kod Finskih ovaca. Proučavanjem mikrosatelita SRYM18 utvrđeno je postojanje 11 haplotipova. Haplotip H6 je najdominantniji kod svih modernih pasmina ovaca neovisno o geografskom položaju. Iako se analiza Y kromosoma pokazala manje informativna od ostalih markera daje nam mogućnost nadopunjavanja znanja o migracijama ovaca dobivenih analizom mitohondrijske DNA te procjenu genetskih odnosa ovaca s njihovim divljim srođnicima.

2.1.4. Polimorfizam jednog nukleotida (SNP - engl. *Single nucleotide polymorphism*)

Polimorfizam jednog nukleotida (SNP - engl. *Single nucleotide polymorphism*) označava promjenu (brisanje, zamjenu ili umetanje) nukleotida na jednoj poziciji u različitim dijelovima genoma. SNP-ovi se javljaju u kodirajućim i ne-kodirajućim regijama genoma, a omogućuju genotipiziranje tisuće polimorfničkih mjesta odjednom.

2.1.4.1. Stvaranje SNP čipa

Stvaranje seta SNP markera koji se mogu koristiti za pronalaženje regija odgovornih za specijaciju i lokalnu adaptaciju životinja te razumijevanje osnovnih sličnosti i razlika između populacija je bilo neophodno za njihovu daljnju primjenu u potrazi za signalima selekcije. Danas se koristi BeadChip tehnologija, gdje se probe za različite SNP biljege nalaze na mikronskim silica kuglicama poslaganim u mikro jažice na površini čipa, slika 4. Tada se nukleotidi bojaju fluorescentnim bojama (svaki nukleotid ima jedinstvenu boju) i omogućavaju očitavanje genotipa jedinke. Za ovce je razvijeno nekoliko panela takvih čipova, a najupotrebljavaniji su Illumina OvineSNP50 BeadChip i Illumina InfiniumOvine HD BeadChip.



Slika 4. SNP čip; izvor: Illumina (<https://emea.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/ovine-snp50.html>; pristup: 01.03.2022.)

Illumina OvineSNP50 BeadChip napravljen je 2009. godine u suradnji s Internacionalnim ovčjim genomskim konzorcijom (engl. *International Sheep Genomics Consortium-ISGC*). Za potrebe dizajniranja ovog čipa genotipizirano je preko 3000 uzoraka iz 75 svjetskih ekonomski najvažnijih pasmina ovaca. Također, u test su ušli i divlji srodnici iz roda *Ovis* (*O. musimon*, *O. canadensis*, *O. dalli*, *O. vignei*, *O. ammon*). Istovremeno može analizirati 12 uzoraka i sadrži 54 241 SNP probu. Obzirom da je prosječni razmak između SNP-ova 50.9 Kb smatra se čipom srednje gustoće. Illumina 50K SNP čip se koristi u određivanju razlika između jedniki (Grasso i sur., 2014), populacija (Kijas i sur., 2012; Ciani i sur., 2014), i vrsta (Miller i sur., 2011). Isto tako koristi se u pronalaženju dokaza o genetskoj osnovi prilagodbe na različite uvjete okoliša (Namroud i sur., 2008), te otkrivanju regija genoma odgovornih za otpornost na bolesti (Riggio i sur., 2014; Mucha i sur., 2015).

Illumina Ovine Infinium HD® SNP čip je dizajniran 2013. godine u suradnji FarmIQ, Illumine i ISGC i sadrži ukupno 606 000 SNP proba. Dizajniran je prvenstveno za procjenu svojstva mesa kod ovaca, no također zadržava vrlo visoku razlučivost i za ostala svojstva pa se tako koristi i kod stvaranja konzervacijskih programa (Macedo i sur., 2014), pronalaženja lokusa odgovornih za određena fenotipska svojstva (Kijas i sur., 2016), procjenu efektivne veličine populacija i genomskog inbridinga (Chitneedi i sur., 2017), procjene strukture populacija (Rochus i sur., 2018).

2.1.4.2. Primjena SNP čipa

Prednost SNP čipova je dostupnost velikog broja markera, male greške u genotipiziranju, usporedivost između laboratorija i mogućnost spajanja podataka iz različitih laboratorija. Osim toga SNP-ovi pokazuju visoku informativnost jer čak i mali broj SNP-ova može imati visok sadržaj informacija važnih za analizu strukture populacije (Lao i sur., 2006; Gurgul i sur., 2013). SNP-ovi su vrlo korisni u analiziranju bioraznolikosti populacija domaćih i divljih životinja, daju sveobuhvatan uvid u njihove genome i omogućavaju razlikovanje čak i usko povezanih pasmina ili populacija. Genomske analize temeljene na SNP-ovima omogućavaju iznimno točno određivanje genomske varijabilnosti različitih vrsta, pasmina i populacija (Kawecka i sur., 2016).

2.2. Konzervacijska genetika

2.2.1. Inbriding

Inbriding predstavlja posljedicu parenja između dvije jedinke u populaciji koje su srodnije od prosječne srodnosti za tu populaciju (Curik i sur., 2014). To je sustav sparivanja 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 (F) važan je parametar koji mjeri razinu inbridinga u nekoj populaciji. Posljedica djelovanja inbridinga povećanje je homozigotnosti populacije, to jest povećanje frekvencije homozigotnih genotipova.

Povećanje homozigotnosti populacije smatra se 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 učinci inbridinga su smanjenje genetskih vrijednosti za svojstva fitnesa, kao što su zdravlje, plodnost i životni vijek, te pojava inbriding depresije koja se očituje smanjenim reproduktivnim kapacitetom ili fiziološkom učinkovitošću. Javlja se kada se recesivni nepoželjni geni nađu u homozigotnom stanju te tada dolaze do izražaja. Preko SNP-ova moguće je odrediti homozigotne odsječke (engl. *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

pedigre (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., 2011). 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 pedigrea 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 pedigreima radi krive interpretacije, krive identifikacije i netočnih zapisa.

2.2.2. Efektivna veličina populacije

Efektivna veličina stvarne populacije (N_e) definirana je kao veličina idealizirane Wright-Fisher-ove populacije u kojoj se može očekivati ista stopa genetskog otklona (engl. *drift*) kao i u promatranoj populaciji (Wang i sur., 2016). Wright-Fisher-ova populacija je definirana kao populacija konstantne veličine bez migracija ili selekcije sa slučajnim sparivanjem jedinki (Wright, 1931). Većina prirodnih populacija nisu idealizirane i efektivna veličina populacije je često manja od broja jedinki u populaciji. Na smanjenu N_e utječu mnogi faktori uključujući variranje u broju jedinki, nejednak omjer spolova i visoka varijanca reproduktivnog uspjeha jedinki (Caballero, 1994). Efektivna veličina populacije temeljni je kriterij za utvrđivanje statusa ugroženosti populacija domaćih životinja. Ona je u korelaciji s inbridingom izračunatim bilo iz pedigrea ili molekularnim putem. Procjenom efektivne veličine populacije možemo predvidjeti gubitak genetske varijabilnosti i stopu povećanja inbridinga (Sargolzaei i sur., 2008; Leroy i sur., 2013). Procjenom trendova efektivne veličine populacije imamo uvid u evolucijsku povijest populacija te dobivamo relevantnu informaciju za očuvanje genetske raznolikosti. Isto tako pomaže objasniti trenutnu razinu genetske raznolikosti kroz retrospektivni pogled (Flury i sur., 2010).

Za većinu prirodnih populacija, N_e se ne može direktno izmjeriti te ju je potrebno procijeniti uz pomoć demografskih ili molekularnih genetskih pristupa (Trask i sur., 2017).

Demografski pristupi procjenjuju N_e kao matematičku funkciju slučajnih demografskih parametara i procesa koji generiraju sadašnju N_e kao što su varijanca u reproduktivnom uspjehu, omjer spolova i fluktuacije u broju jedinki. Takvi demografski pristupi procjenjuju varijancu efektivne veličine populacije (npr. varijancu uzorkovanja u alelnim frekvencijama po generaciji) i tako određuju N_e za generaciju potomstva (Caballero, 1994). Te metode osim što procjenjuju N_e u jednoj točki također direktno identificiraju ključne demografske procese koji oblikuju N_e . Obzirom da su često dovoljne količine podataka da bi se upotrijebio demografski procjenitelj nedostupne, N_e se često procjenjuje iz molekularnih genetskih podataka (Trask i sur., 2017). Najčešće se koriste procjene efektivne veličine populacije bazirane na gubitku genetske raznolikosti preko inbridinga ili genetskog drifta. Razvijeno je nekoliko metoda za procjenu efektivne veličine populacije uzimajući u obzir korelaciju između alelnih frekvencija ili homozigotnih regija (Sved, 1971; Hayes i sur., 2003; Li i Durbin, 2011). Formula za izračun efektivne veličine populacije preko inbridinga je: $N_e = 1/2\Delta f$, pri čemu je N_e , efektivna veličina populacije, a Δf , stopa inbridinga. Niska efektivna veličina populacije ukazuje na visoki inbriding i gubitak genetske raznolikosti.

2.3. Dosadašnja genetska istraživanja hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Hrvatske izvorne pasmine ovaca kombiniranih su proizvodnih osobina, ali se primarno uzgajaju radi proizvodnje mesa (janjetine) u ekstenzivnom sustavu. U navedenom sustavu držanja primjena selekcijskih metoda je otežana te se one uglavnom niti ne provode. Izuzetak su pasmine koje se primarno koriste za proizvodnju mlijeka kao što su paška i istarska ovca kod kojih se provodi selekcija na mliječnost.

Pa su tako jedna od prvih genetskih istraživanja na hrvatskih izvornim pasminama ovaca bila na genetskim polimorfizmima β -laktoglobulina na paškoj ovci (Cubric Čurik V. i sur., 2002, Čubrić Čurik V., 2005). Kombinacijom izoelektričnog fokusiranja i PCR-RFLP metode utvrđeno je da paška ovca ima slične frekvencije alela i genetske varijante kao mediteranske mliječne pasmine ovaca uzgajane u sličnim uvjetima. Frekvencije genotipa β -laktoglobulinskog lokusa pokazale su signifikantno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže sugerirajući veću zastupljenost heterozigotnog genotipa za svojstvo proizvodnje mlijeka i sira. Osim polimorfizama β -laktoglobulina promatrani su i polimorfizmi α_{S1} -kazeina (Čubrić Čurik V., 2005), te polimorfizam na κ -kazein kodirajućoj regiji (Feligini i sur., 2005). U populaciji paške ovce utvrđene su četiri varijante α_{S1} -kazeina, a frekvencija D (Welsh) varijante je bila niska slično talijanskoj pasmini sarda (Čubrić Čurik V., 2005). U istraživanju polimorfizma jednog nukleotida κ -kazeina od tri populacije ovaca uključenih u istraživanje

jedino su kod paške ovce utvrđeni svi heterozigotni SNP-ovi na poziciji 237 ovčje κ -kazein mRNA (Feligini i sur., 2005).

Donošenjem zakona o obaveznom genotipizanju na grebež ovaca na području Europske unije, u Hrvatskoj tada kao pridruženoj članici su se također provodile analize raznolikosti prionskog gena autohtonih pasmina ovaca hrvatskog priobalja i otoka s ciljem utvrđivanja otpornosti/podložnosti na bolesti grebeži ovaca (Čubrić Čurik V., 2009). Analizom je identificiran veliki broj polimorfnih alela kod analiziranih pasmina. Osim poznatih polimorfizama, otkrivena su i tri nova alela, te Nor98 varijanta na kodonu 141 povezna s atipičnom grebeži. Cubric Curik i sur. (2009) analizirali su polimorfizme ovčjeg PrP gena povezanog s grebeži ovaca kod istarskih ovaca i njezinih križanaca. Rezultati pokazuju da je frekvencija VRQ alela bila ekstremno niska što ukazuje na to da u populaciji istarske ovce postoji vrlo niska frekvencija genotipova visoko podložnih bolesti grebež ovaca.

Genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina ovaca istraživana je pomoću različitih markera. Tako su Ivanković i sur. (2005) analizirali genetsku varijabilnost paške ovce na sedam mikrosatelitnih markera i D-loop regije mitohondrijske DNA. Autori navode veliku genetsku varijabilnost paške ovce i najveću zastupljenost M i P mtDNA haplotipa. Varijabilnost haplotipova mtDNA i Y kromosoma na devet izvornih hrvatskih pasmina ovaca i muflonu proučavali su Ferencakovic i sur., (2012). Autori su analizom mtDNA utvrdili homogeno majčinsko porijeklo uz dominaciju B halopgrupe kod ovaca i muflona, dok je analiza Y kromosoma pokazala izuzetno velik broj haplotipova kod ovaca, a prisustvo samo jednog haplotipa (HY-6) kod muflona.

Ćinkulov i sur. (2007) promatrali su genetsku raznolikost balkanskih pramenki te potvrdili da je istarska ovca genetički drugačija od ostalih pramenki koristeći mikrosatelitne markere, te su na temelju analize mitohondrijske DNA dokazali pripadnosti istarske ovce A i B haplogrupi. Lawson Handley i sur. (2007) su istraživali genetsku strukturu europskih pasmina ovaca koristeći 23 mikrosateltina lokusa, a u istraživanje su uključili istarsku ovcu. Kod istarske ovce utvrđena je najveća opažena heterozigotnost, dok analizom glavnih komponenti i strukture populacija je potvrđeno genetsko odvajanje istarske ovce od ostalih europskih pasmina ovaca. Salamon i sur. (2012 i 2015) analizirali su četiri populacije ovaca upotrebljavajući 23 mikrosatelitna markera s ciljem da objasne genetsku raznolikost i strukturu istarskih ovaca analizirajući dvije odvojene populacije istarske ovce (hrvatsku i slovensku) koristeći krčku ovcu i ličku pramenku kao outgrupe. Rezultati su pokazali veliku genetsku raznolikost krčke ovce i istarske ovce dok uspoređujući dvije populacije istarske ovce, manja i reproduktivno izolirana istarska ovca u Sloveniji je pokazala manju genetsku raznolikost i veću razinu inbridinga. Genetska diferenciranost ličke pramenke, istarske ovce i creske ovce također je potvrđena na 27 mikrosatelitnih markera u istraživanju Salamon i

sur. (2014) u kojem je također utvrđena najmanja genetska raznolikost ličke pramenke i rapske ovce, a najveća raznolikost paške i istarske ovce. Analiziran je utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na sezonu janjenja kod hrvatskih izvornih pasmina ovaca (Držaić, 2016; Držaić i sur. 2016; Držaić i sur., 2020). Autori su utvrdili visoku frekvenciju polimorfizama MTNR1A gena u gotovo svih istraživanih hrvatskih izvornih pasmina ovaca.

Novija istraživanja temelje se na proučavanju genetske raznolikosti hrvatskih izvornih pasmina ovaca upotrebljavajući visoko rezolutne genomske markere poput polimorfizama jednog nukleotida- SNP (Šalamon i sur., 2018; Drzaic i sur., 2019; Drzaic i sur., 2020; Ferenčaković i sur., 2020; Lukic i sur., 2020; Ciani i sur., 2020; Shihabi i sur., 2021; Shihabi i sur., 2022) ili sekvenci cijelog genoma ovaca (Deng i sur., 2020; Lv i sur., 2021). Osim genomskih markera u procjeni genetskih parametara također se koriste i informacije iz pedigrea (Kasap i sur., 2021; Špehar i sur., 2022).

U istraživanju temeljenom na 50K SNP čipu dalmatinska pramenka imala je najmanji koeficijent inbridinga i najveću opaženu heterozigotnost u usporedbi s osam europskih pasmina (Salamon i sur., 2018), a u analizi strukture populacija 18 europskih pasmina ovaca kod dalmatinske pramenke je utvrđeno jasno odvajanje pasmine uz približavanje ostalim balkanskim pramenkama (Drzaic i sur., 2019). Sedam hrvatskih izvornih pasmina (dalmatinska pramenka, lička pramenka, istarska ovca, creska ovca, paška ovca, rapska ovca i krčka ovca) uključene su u opsežno istraživanje Ciani i sur. (2020) temeljeno na 50 K SNP čipu kojim je utvrđeno da hrvatske izvorne pasmine se jednim dijelom preklapaju s ostalim balkanskim pramenkama dok su jasno odvojene od ostalih pasmina u okruženju. Autori sugeriraju da balkanske pramenke zajedno s talijanskim ovcama predstavljaju središnju regiju širenja ovaca u ostatak Europe.

Koristeći visoko rezolutni SNP čip (Infinium HD ovine) s ukupno dostupnih 606 000 markera analizirana je populacijska struktura osam hrvatskih izvornih pasmina ovaca, grafički prikazani odnosi između populacija (Drzaic i sur., 2020), određene CNV (engl. copy number variations) regije (Ferenčaković i sur., 2020), identificirani signali selekcije na autosomalnim kromosomima upotrebom četiri različita pristupa (Lukic i sur., 2020) te identificirani signali selekcije specifični za X kromosom pomoću dvije metode (Shihabi i sur., 2021, Shihabi i sur., 2022).

Sekvence cijelih genoma paške ovce i dalmatinske pramenke korištene su u analiziranju raznolikosti Y kromosoma na globalnoj razini, rekonstrukciji migracijskih ruta ovaca i načinima ovčarenja u prošlosti (Deng i sur., 2020). Iste jedinice korištene su u analizi genetske raznolikosti svjetskih pasmina ovaca, proučavanju introgresije divljih srodnika ovaca u domaće ovce i identifikaciji gena povezanih s važnim osobinama ovaca za stočarsku proizvodnju (Lv i sur., 2021).

uzgajalo 1 105 078 ovaca (Defilipis, 1966). Tijekom godina pod utjecajem kulturno - ekonomskih uvjeta i strukture poljoprivredne proizvodnje počele su se formirati zasebne pasmine. Također, stočari su počeli uvoziti strane pasmine ovaca kako bi poboljšali proizvodnju svojih ovaca (Mitić, 1987). Tako su već 1848. godine počeli uvoziti merino ovnove radi poboljšanja svojstava vune (Defilipis, 1966). Ovnovi merino pasmina uvažani su u još nekoliko navrata, a 1942. godine uvezeno je 1 250 jedinki oplemenjene njemačke ovce. Nesistematiziranim križanjem domaćih pasmina ovaca s uvezenim ovama došlo je do stvaranja novih populacija koje su se počele razlikovati po svojim morfološkim i fiziološkim osobinama, a specifične su za određene mikroregije Dalmacije (Mitić, 1987). Od 1808. godine kada smo imali najveći broj ovaca po stanovniku na području Europe broj ovaca je bio u konstantnom opadanju sve do posljednjih nekoliko godina. Tako je 1939. zabilježeno 827 982 ovaca, 1969. godine 664 988 ovaca, 1998. godine 427 000. U Hrvatskoj se 2020. godine ukupno uzgajalo približno 613 000 jedinki (48 923 uzgojno valjanih grla) i 18 različitih pasmina ovaca.

2.6. Pasmine ovaca

Pasmine ovaca se dijele u kategorije prema različitim svojstvima, a jedna od mnogih podjela je na oplemenjene i izvorne pasmine (Mioč i sur., 2007). U Hrvatskoj postoji devet izvornih pasmina ovaca: istarska ovca, creska ovca, rapska ovca, krčka ovca, paška ovca, dalmatinska pramenka, lička pramenka, cigaja i dubrovačka ovca koje čine 75% ukupnog broja ovaca u Republici Hrvatskoj (Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, 2021). Hrvatske izvorne pasmine ovaca pripadaju pramenka tipu ili su nastale na osnovi pramenka tipa ovaca.

2.6.1. Pramenka

Pojam pramenka se najvećim dijelom odnosi na izvorne ovce s područja jugoistočne Europe – Balkana. Osim na području Balkana nastanjuje različite dijelove svijeta. Poznata je još pod nazivima „zackel“ (centralna Europa), „tzurcana“ (Poljska, Rumunjska) i „valachian“ (Grčka). Karakterizira ju otvoreno runo s dugačkim i šiljastim pramenovima većinom sastavljeno od grubih vlakana (Mitić, 1987). Pramenka čini grupu primitivnih nisko proizvodnih ovaca koje su prilagođene ostrim i oskudnim uvjetima hranidbe i držanja. Također, vrlo je otporna i izdržljiva ovca. Unutar pojma pramenka postoje različite pasmine/sojevi koje se međusobno osim po svojoj prilagođenosti na mikroklimatske uvjete, koji se jako razlikuju od mjesta uzgoja, razlikuju i u veličini te boji i kvaliteti vune. No sve pasmine imaju karakteristična fenotipska obilježja (glava, donji dio trbuha i noge su obrasli

dlakom, ovnovi su rogati dok su ovce uglavnom šute, snažne noge s jakim kostima i čvrstim papcima, kombinirana proizvodna svojstva). Pramenka se može podijeliti na pasmine s grubom vunom i pasmine s rudom vunom (Mitić, 1987).

Sve hrvatske izvorne pasmine uzgajaju se u ekstenzivnom sustavu i prilagođene su na različite mikroklimatske uvjete mjesta uzgoja. Dalje u poglavlju bit će opisane hrvatske izvorne pasmine korištene u izradi ovog doktorskog rada.

2.6.2. Krčka ovca

Krčka ovca nastala je oplemenjivanjem lokalnih ovaca otoka Krka s uvezenim merino ovcima. Točno vrijeme nastanka pasmine je nepoznato, no prvi zapisi o pasmini datiraju još od 17. stoljeća kada se u venecijanskim izvješćima spominje da se na otoku Krku uzgaja ukupno 34 740 grla sitne stoke. Zabilježeno je da je na otoku Krku proveden proces merinizacije 1939. godine (Barać i sur., 2011).



Slika 6. Krčka ovca

Krčka ovca je prilagodljiva, otporna, skromna ovca manjeg tjelesnog okvira, mase oko 35 kg, slika 6. Pripada skupini ovaca kombiniranih proizvodnih svojstava s naglaskom na meso. Vuna je kod većine životinja bijele boje poluzatvorenog tipa iako postoje i jedinke sa smeđim, sivim i crnim runom. Trbuh i donji dijelovi nogu nisu obrasli vunom, već gustom dlakom (Mioč i sur., 2007).

Broj krčkih ovaca je drastično pao s 580 grla koliko ih je bilo zabilježeno 2019. godine na 186 uzgojno valjanih grla (164 ovce, 20 šiljezica i 2 ovna) u 2020. godini. Krčke ovce se uzgajaju na četiri gospodarstva (Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, 2021). Procijenjena ukupna populacija krčke ovce iznosi 18 000 grla.

2.6.3. Rapska ovca

Izvorna hrvatska ovca koja je nastala i uzgaja se isključivo na otoku Rabu je rapska ovca. Iako se prema fenotipskim odlikama runa smatra da su u formiranju pasmine utjecaj imale merino ovce, o tome ne postoje zapisi. Današnji uzgoj predstavljen je starim otočnim tipom ovce te se smatra da desetljećima nije bilo genetskih upliva drugih pasmina. Pasminu obilježava otpornost, skromnost i prilagodljivost na krševite terene pa od tuda i lokalni naziv *škraparica* (Barać i sur.,2006).



Slika 7. Rapska ovca

Pripada skupini ovaca kombiniranih proizvodnih osobina s naglaskom na meso. Rapska ovca je sitna, skladno građena i izdržljiva ovca tjelesne mase između 30 i 45 kg, slika 7. Tijelo je obraslo poluzatvorenim najčešće bijelim runom iako su prisutna i smeđa i crna grla, dok su noge i trbuh obrasli gustom dlakom (Mioč i sur., 2007).

Rapska ovca se uzgaja na 13 gospodarstava, a broj uzgojno valjanih životinja se smanjuje. U 2020. godini ukupno je zabilježeno 409 uzgojno valjanih životinja (342 ovce, 63 šiljezice i 4 ovna) dok se ukupna populacija procjenjuje na 6 500 grla (Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, 2021).

2.6.4. Creska ovca

Točnih podataka o podrijetlu creske ovce nema. Prvi zapisi o creskoj ovci datiraju iz 1332. godine gdje se ovčarstvo spominje kao važna gospodarska grana na otoku Cresu (Barać i sur., 2011). Posavi i sur. (2002) spominju da je između dva svjetska rata provedeno križanje creske ovce s karakul ovnovima, a s namjerom proizvodnje krzna. Također, navode kako su nakon drugog svjetskog rata lokalne izvorne ovce križane s merino ovnovima pasmine gentile di puglia no križanci se nisu koristili u daljnjem uzgoju.



Slika 8. Creska ovca

Creska ovca se danas uzgaja na otocima Cresu i Lošinju. Creska ovca manjeg je tjelesnog okvira tjelesne mase oko 45 kg, skladne građe, slika 8. Tijelo joj je prekriveno poluzatvorenim runom bijele boje dok su noge i trbuh prekriveni dlakom (Mioč i sur., 2007). Finoća runskog vlakna iznosi 28,73 μm kod ovaca i 31,68 μm kod ovnova te pripada u

oplemenjene ovce najfinije vune (Mitić, 1987). Creska ovca se uzgaja na pet gospodarstava i u 2020. godini je imala 979 uzgojno valjanih životinja (744 ovaca, 233 šiljezica, 3 ovna). Procijenjena veličina populacije je 15 000 grla (Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, 2021).

2.6.5. Paška ovca

Paška ovca nastala je križanjem izvorne otočke pasmine i merino ovnova negretti i bergamo pasmine (Jardas, 1951). Osim tih pasmina spominje se i utjecaj pasmine gentile di puglia, no dokazi o njihovom utjecaju ne postoje. Rad na genetičkom poboljšanju paške ovce počeo je 1870. godine osnivanjem društva za unapređenje ovčarstva „Gregge Modella“ (Pavlinić, 1936). U drugoj polovini 20. stoljeća bilo je pokušaja oplemenjivanja paške ovce sa sardom i awassi pasminom radi povećanja mliječnosti, no okolišni uvjeti nisu dozvolili zadržavanje tih pasmina u genotipu paške ovce (Horvath, 1996). Paška ovca je prvenstveno namijenjena proizvodnji mlijeka. Najvažniji proizvodi su svjetski poznati paški sir i paška janjetina.

Tijelo paške ovce prekriveno je zatvorenim do poluzatvorenim runom bijele boje, dok su trbuh i noge prekriveni dlakom s prisutnim pjegama različite veličine i boje (slika 9.), (Mioč i sur., 2007). Tjelesna masa ovaca je oko 45 kg (Barač i sur., 2008).



Slika 9. Paška ovca

Paška ovca je jedna od hrvatskih brojniji izvornih pasmina. U 2020. godini imala je 4 493 uzgojno valjanih grla (4 178 ovaca, 235 šiljezica, 80 ovnova) rasprostranjenih na 34

gospodarstva. Uzgaja se na istoimenom otoku Pagu te u zaleđu Zadra. Procjenjuje se da je ukupna veličina populacije paške ovce 30 000 grla.

2.6.6. Istarska ovca

Istarska se ovca uzgaja isključivo na istarskom poluotoku. Dokazi o porijeklu istarske ovce ne postoje, no smatra se da je nastala na temelju sjeverno - talijanskih pasmina, prvenstveno bergamo ovce. Prema zapisu Putinja (2005) po nalogu carice Marije Terezije, a u svrhu oplemenjivanja izvornih istarskih ovaca, 1771. godine uvezeni su ovnovi pasmina gentile di puglia, southdown, merinolandschaf, bergamo, merino i drugi. Od druge polovine 19. stoljeća nisu uvažane druge pasmine ovaca (Mioč i sur., 2012).

Po svom izgledu jako se razlikuje od ostalih hrvatski izvornih pasmina ovaca (slika 10). Prepoznatljiva je po konveksnom nosnom profilu, crno bijeloj boji vune i dlake te razvijenim rogovima. Istarska ovca je većeg tjelesnog okvira i doseže tjelesnu masu od 70 kg u prosjeku, slika 10. Pripada prema proizvodnom tipu u skupinu mliječnih ovaca te je najmlječnija hrvatska izvorna pasmina ovaca. Prosječno proizvede 135 – 145 litara mlijeka u periodu trajanja laktacije (6 – 8 mjeseci).



Slika 10. Istarska ovca

Istarska ovca uz dubrovačku ovcu je jedina hrvatska izvorna pasmina čija su sva grla obuhvaćena uzgojno – selekcijskim radom. Njezin broj je kroz godine varirao te je u

jednom trenutku toliko pao da je bila kritično ugrožena pasmina (Mioč i sur., 2012). Danas istarska ovca ima 1 302 uzgojno valjane životinje (1 087 ovaca, 176 šiljezica, 39 ovnova) koje se uzgajaju na 14 gospodarstava.

2.6.7. Lička pramenka

Lička pramenka nastala je na planinskim predjelima Like i Gorskog kotara. Pasma je posebno prilagođena oštrim zimama i sušnim ljetima. Tijekom povijesti zabilježeni su konstantni pokušaji oplemenjivanja, najprije ovnovima dubskog i privorskog soja pramenke (Mitić, 1987), a kasnije i europskim mesnim pasminama ille de france i merinolandschaf te nekim australskim pasminama. Tijelo ličke pramenke je prekriveno otvorenim, bijelim runom sastavljenim od šiljastih i bičastih pramenova, dok su glava, noge i trbuh prekriveni kratkom dlakom obično tamnije boje, slika 11. Lička pramenka je ovca srednje veličine sa skladnim i čvrstim okvirom tjelesne mase oko 50 kg (Mioč i sur., 2007).



Slika 11. Lička pramenka; izvor: Brajković V.

Lička pramenka čini ukupno 29,96% ukupne uzgojno valjane populacije svih izvornih ovaca Republike Hrvatske što je čini pasminom s najvećim brojem jedinki obuhvaćenih uzgojnim programom. Procijenjena veličina populacije je 30 000 jedinki, dok je 14 655 uzgojno valjanih jedinki (11 962 ovaca, 2 289 šiljezica, 404 ovnova), (Hrvatska

agencija za poljoprivredu i hranu, 2021). Jedina je izvorna pasmina koja je zabilježila porast broja uzgojno valjanih jedinki u odnosu na prethodnu godinu.

2.6.8. Dalmatinska pramenka

Dalmatinska pramenka obuhvaća izvorne ovce koje se uzgajaju na području Velebita, Dinare, Svilaje, Kamešnice, Biokova, Dalmatinske zagore, Ravnih kotara, Cetinjske krajine te na nekim otocima (Mioč i sur., 2007). Obzirom da je pasmina tek odnedavno definirana ne postoje zapisi o nastanku pasmine. Pretpostavlja se da je formiranje pasmine u uskoj vezi s ostalim pramenkama koje se uzgajaju na Balkanskom poluotoku (Rako, 1942). Dalmatinska pramenka je sitna ovca snažne konstitucije. Iako kombiniranih proizvodnih svojstava koristi se pretežno za proizvodnju mesa, slika 12. Tijelo joj je prekriveno otvorenim najčešće bijelim runom. Glava je kao i noge najčešće crno pigmentirana iako postoje i grla s bijelom glavom (Mioč i sur., 2007).

Dalmatinska pramenka je najbrojnija izvorna pasmina s procijenjenom veličinom populacije od 280 000 jedinki. Ukupno ima 11 734 uzgojno valjanih grla (10 011 ovaca, 1 511 šiljezica, 212 ovnova), (Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, 2021.).



Slika 12. Dalmatinska pramenka

2.6.9. Dubrovačka ovca – ruda

Mjesto i vrijeme nastanka dubrovačke ovce nije poznato no pretpostavlja se da je nastala križanjem izvornih pramenki s merino pasminom još za vrijeme Dubrovačke republike (Mioč i sur., 2007). Dubrovačka ovca se uzgaja na uskom pojasu jadranske obale od poluotoka Pelješca do granice s Crnom Gorom, a najviše na području Imotice i u Konavlima (Barać i sur., 2011).

Dubrovačka ovca je srednje razvijena i skladno građena ovca težine oko 50 kg. Tijelo joj je prekriveno zatvorenim do poluzatvorenim runom bijele boje, a glava, trbuh i noge gustom dlakom (Mioč i sur 2007), slika 13.

Za vrijeme Domovinskog rata i okupacije Dubrovačko – neretvanske županije broj grla se drastično smanjio te je pasmina gotovo nestala. Zajedničkim radom nekoliko institucija pasmina je 2005. – 2006. godine revitalizirana, ali je i dalje naša najugroženija pasmina (Barać i sur., 2011). Trenutno broji 1 285 uzgojno valjanih jedinki (1 027 ovaca, 209 šiljezica, 49 ovnova) koje su sve obuhvaćene uzgojno – selekcijskim radom (Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, 2021).



Slika 13. Dubrovačka ovca – ruda; izvor: Hrvatski savez uzgajivača ovaca i koza (<http://www.ovce-koze.hr/ovcarstvo-kozarstvo/ovcarstvo-i-kozarstvo-u-rh/ovcarstvo-i-kozarstvo-u-rh/pasmine-ovaca/dubrovačka-ovca-ruda/>; pristup: 25.02.2022.)

2.6.10. Europski muflon (*Ovis musimon*)

Europski muflon je divlji izvorni oblik ovce, slika 14. Smatra se da je na područje Sardinije i Korzike došao prije 7 000 godina. U svom divljem obliku i danas živi na tim otocima dok je u ostatak Europe introducirana. Muflon je u Hrvatsku uvezen 1900. godine na područje Novog Marofa (Krapinec, 2001), no ta je populacija istrebljena. Druga introdukcija muflona dogodila se 1908. godine na otok Brijune. Od tada je muflon konstantno prisutan na teritoriju Hrvatske. Danas muflon naseljava brojne Jadranske otoke (Brijuni, Cres, Lošinj, Rab, Dugi Otok, Brač, Hvar) kao i kopnene dijelove Hrvatske (Kušac i Krapinec, 2010).

Na temelju analize sekvence cijelog genoma procjenjuje se da se razdvajanje *O. musimona* i *O. ariesa* dogodilo prije 7,6 milijuna godina (Su i sur., 2020).



Slika 14. Muflon; izvor: Rab Archeological Traces (<https://morski.hr/2020/06/08/rab-muzej-na-otvorenom-i-40-km-staza-kroz-netaknutu-prirodu/>; pristup: 25.02.2022)

3. MATERIJALI I METODE

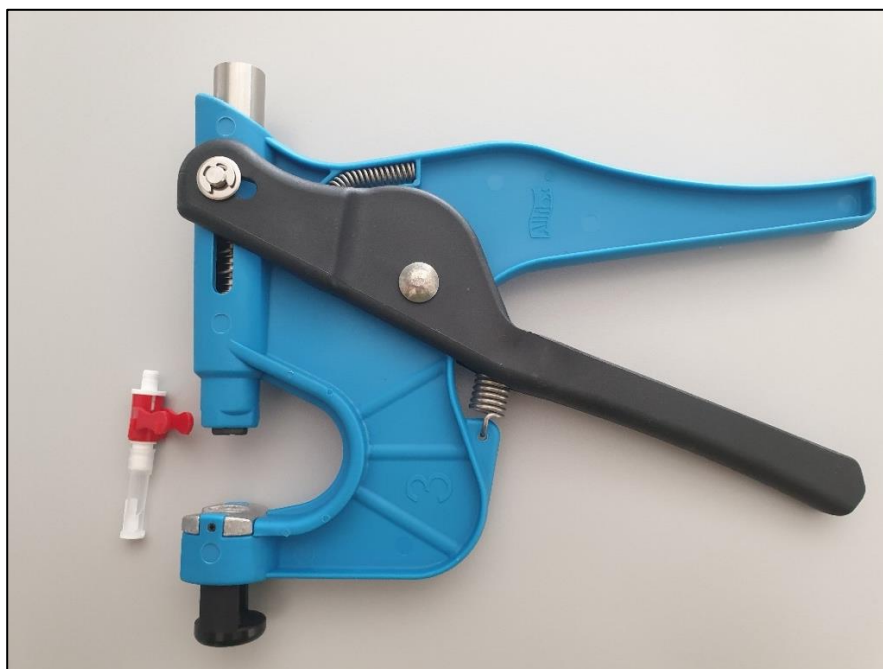
3.1. Biološki materijal

Istraživanje je provedeno na ukupno 220 uzoraka od čega je 210 uzorka ovaca i 10 uzoraka muflona. Jedinke su birane na način da uzorak bude što reprezentativniji za populaciju kojoj pripada. Gdje je bilo moguće izabirane su jedinke iz što više različitih stada, sa što većeg uzgojnog područja. Osam pasmina pripadalo je hrvatskim izvornim pasminama: creska ovca (20 jedinki), dalmatinska pramenka (26 jedinki), dubrovačka ovca (26 jedinki), istarska ovca (25 jedinki), krčka ovca (20 jedinki), lička pramenka (20 jedinki), paška ovca (45 jedinki), rapska ovca (20 jedinki). Jedna pasmina pripadala je izvornoj makedonskoj pramenki (8 jedinki), (Tablica 1).

Tablica 1. Broj uzoraka i lokacija po pasmini

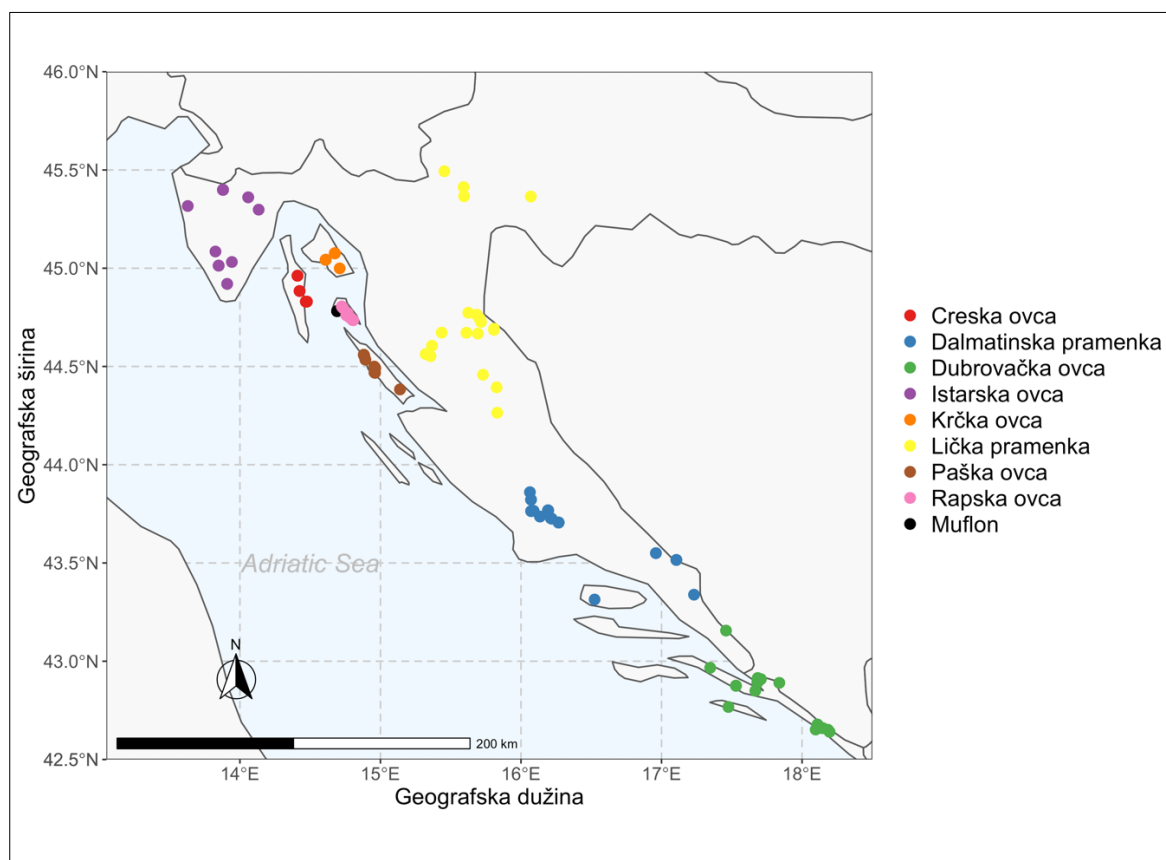
Porijeklo pasmine	Ime pasmine	Oznaka	N jedinki	Uzorak	N stada
Hrvatska	creska ovca	CIS	20	tkivo	5
Hrvatska	dalmatinska pramenka	DPS	26	krv/tkivo	18
Hrvatska	dubrovačka ovca	DRS	26	krv/tkivo	17
Hrvatska	istarska ovca	ISS	25	krv/tkivo	8
Hrvatska	krčka ovca	KIS	20	tkivo	3
Hrvatska	lička pramenka	LPS	20	tkivo	20
Hrvatska	paška ovca	PIS	45	krv/tkivo	16
Hrvatska	rapska ovca	RIS	20	tkivo	17
Hrvatska	muflon	EMC	10	tkivo	1
S. Makedonija	makedonska pramenka	NMS	8	tkivo	1

Prikupljanje uzoraka krvi i tkiva provedena su na području Republike Hrvatske i Sjeverne Makedonije u uzgojnim područjima pojedinih pasmina na ukupno 106 gospodarstava. Krv je uzimana iz jugularne vene (*vena jugularis*) u količini od 7 ml u epruvete s EDTA puferom (etilendiaminotetraoctena kiselina) i čuvana do izolacije DNA u zamrzivaču na temperaturi od $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tkivo je uzimano s uha, Allflex TSU aplikatorom (Allflex, France, Slika 15.) i spremno u pripadajuće bočice s konzervansom te do analiza čuvano na sobnoj temperaturi.



Slika 15. Sustav za uzimanje uzoraka tkiva uha životinje

Broj prikupljenih uzoraka, tip prikupljenog uzorka te broj lokacija po pojedinim pasminama prikazani su u tablici 1. i na slici 16. Lokacija, spol te geografske koordinate svake jedinice prikazani su prilogu 1.



Slika 16. Karta mjesta uzorkovanja hrvatskih izvornih pasmina ovaca

3.2. Dodatni uzorci

Osim materijala prikupljenih na gospodarstvima u Republici Hrvatskoj i Sjevernoj Makedoniji u ovom istraživanju korišteno je 359 genotipova prikupljenih iz rada Cao i sur. (2020) te s javno dostupnih baza podataka (Dryad – www.datadryad.org). Šest pasmina preuzeto je iz rada Cao i sur.(2020): altamura (15 jedinki), lecese (15 jedinki), karpatska planinska ovca (13 jedinki), pramenka (Srbija; 13 jedinki), sumavska ovca (7 jedinki), valachian (7 jedinki). Četrnaest pasmina je preuzeto s javno dostupnih baza: churra ovca (15 jedinki), blanche du massif central (20 jedinki), cause du lot (20 jedinki), corse (16 jedinki), lacaune - mliječni tip (36 jedinki), lacaune - mesni tip (34 jedinke), limousine (18 jedinki), australski merino (18 jedinki), mourerous (16 jedinki), manech tête rouge (25 jedinki), noire du velay (19 jedinki), préalpes du sud (17 jedinki), rava (20 jedinki), tarasconnaise (15 jedinki). Broj uzoraka, porijeklo pasmine, lokacija uzorka i izvor genotipa dodatnih uzoraka prikazani su u prilogu 2.

3.3. Ekstrakcija DNA

Iz prikupljenih uzoraka krvi i tkiva izolirana je genomska deoksiribonukleinska kiselina (DNA) korištenjem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany), slika 17. Prije početka postupka izolacije DNA pripremljene su otopine potrebne u postupku izolacije: 98 ml koncentrata otopine za ispiranje DNA (AW1) razrijeđen je sa 130 ml 96% etanola, dok je 66 ml koncentrata otopine za ispiranje DNA (AW2) razrijeđeno sa 160 ml 96% etanola. Prije početka procesa ekstrakcije inkubator s opcijom tresenja je prethodno zagrijan na 56 °C. DNA ekstrakcija je provedena prema uputama proizvođača.



Slika 17. Sadržaj kita za izolaciju DNA iz krvi i tkiva

3.3.1. Postupak ekstrakcije DNA iz krvi

1. Priprema uzorka krvi za ekstrakciju

Uzorci krvi su odmrznuti na sobnoj temperaturi i lagano promiješani.

2. Razgradnja stanične stijenke

U 1.5 ml epruvetu stavljeno je 20 µl proteinaze K i 200 µl krvi.

Nakon toga dodano je 200 µl AL pufera. Sadržaj je vorteksiran 15 s te stavljen inkubirati na 56 °C 10 min uz trešnju od 500 rpm-a na uređaju Thermo Shaker TS-100.

3. Priprema za vezanje DNA na kolone

Nakon inkubacije u epruvetu je dodano 200 µl 96% etanola te je sadržaj vorteksiran 15 s.

4. Vezanje DNA na kolone

U ovom koraku sadržaj iz 1.5 ml epruvete je prebačen u tubice s kolonama od 2 mL (DNeasy Mini spin column), a zatim su tubice centrifugirane u trajanju od 1 min na 8 000 rpm-a. Tekući sadržaj koji je prošao kroz kolone je bačen i kolone su stavljene u nove tubice.

5. Prvi korak pročišćavanja DNA

Na kolone je dodano 500 µl AW1 pufera, a zatim su tubice centrifugirane u trajanju od 1 min na 8 000 rpm-a. Tekući sadržaj koji je prošao kroz kolone je bačen i kolone su stavljene u nove tubice.

6. Drugi korak pročišćavanja DNA

Na kolone je dodano 500 µl AW2 pufera, a zatim su tubice centrifugirane u trajanju od 3 min na 14 000 rpm-a. Tekući sadržaj koji je prošao kroz kolone je bačen i kolone su vraćene u tubice.

7. Priprema za otapanje DNA

Kako bi se kolone što bolje osušile i etanol ishlapio provelo se dodatno centrifugiranje u trajanju od 1 min na 14 000 rpm-a.

8. Otapanje DNA

Kolone su prebačene u nove 1.5 ml epruvete i u sredinu kolone je dodano 200 µl AE pufera. Uzorci su potom inkubirani 3 min na sobnoj temperaturi pa centrifugirani u trajanju od 1 min na 8 000 rpm-a. Tekući sadržaj koji je prošao je ekstrahirana DNA i on se sprema, a kolone se bacaju.

3.3.2. Postupak ekstrakcije DNA iz tkiva

1. Priprema uzorka tkiva za ekstrakciju

Za ekstrakciju DNA iz tkiva potrebni su nam dezinficirani skalpel, podloga za rezanje, pinceta i škare. TSU bočice su se škarama otvorile i iz njih se pincetom izvadilo

uzorkovano tkivo. Tkivo se rezalo skalpelom na što sitnije komade i prebacilo u 1.5 ml epruvete. Nakon pripreme svakog uzorka korišteni pribor se dezinficirao.

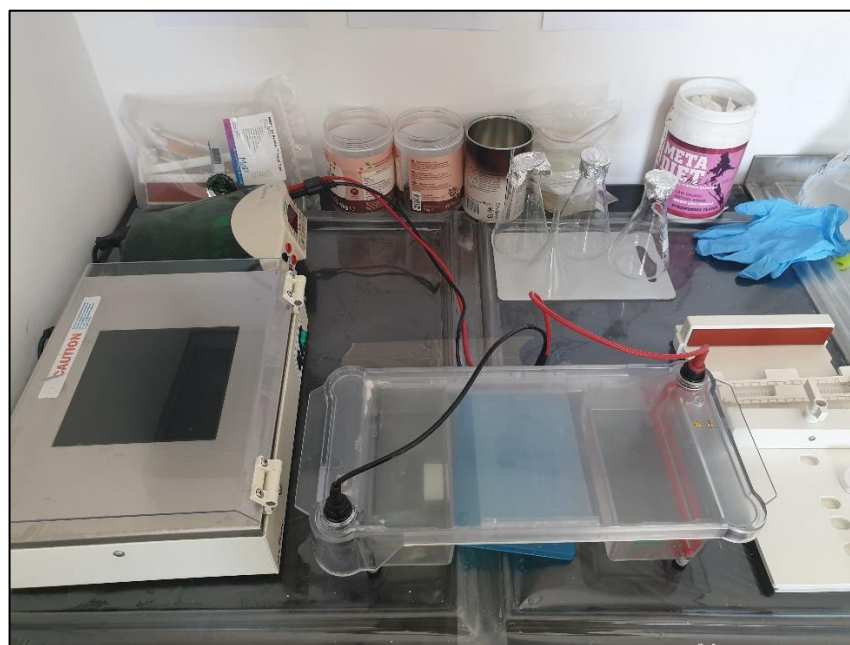
2. Razgradnja stanične stjenke

U 1.5 ml epruvetu s uzorkom dodalo se 20 μ l proteinaze K i 200 μ l AL pufera. Sadržaj je vorteksiran 15 s te stavljen inkubirati na 56 °C, 3 h ili dok se tkivo ne razgradi, uz trešnju od 500 rpm-a na uređaju Thermo Shaker TS-100.

Daljnji koraci ekstrakcije DNA iz tkiva bili su identični onima opisanim u postupku ekstrakcije DNA iz krvi.

3.4. Provjera kvalitete i kvantitete DNA

Kontrola uspješnosti ekstrakcije DNA izvršena je na 1% agaroznom gelu pomoću gel elektroforeze, slika 18. Za izradu gela korišten je 1 g agaroze i 100 mL 1x TBE pufera (0,5 M Tris baza, 0,5 M borna kiselina, 10 mM EDTA), zagrijanih do točke vrenja u koje je nakon hlađenja gela na 60 °C dodano 13 μ l etidijevog bromida. Kako bi se DNA fiksirala u jažice na gelu, 5 μ l DNA pomiješano je s 2 μ l metil-orange boje te je takva DNA aplicirana na gel. Elektroforeza je trajala 40 min na 130 V.



Slika 18. Sustav za gel elektroforezu

Vizualizacija je provedena pomoću etidij bromida (EtBr) osvjetljavanjem gela ultraljubičastim (UV) svjetlom na UV transiluminatoru (Biorad, slika 18.) i uređaju za snimanje gela UVItch explorer Version 15.01.c (UVItch Ltd., Cambridge, UK) (Slika 19.).



Slika 19. Uređaj za snimanje gela UVltech explorer Version 15.01

Kvantiteta i čistoća ekstrahirane DNA je određena uređajem NanoPhotometer P330 Spektrofotometer (IMPLEN, Njemačka) (Slika 20).



Slika 20. NanoPhotometer P330 Spektrofotometer

Količina DNA od 1 μ l je bila dovoljna za mjerenje koncentracije u jedinicama μ l/ng. Čistoća DNA je određena omjerom apsorbancije pri valnim duljinama 260nm i 280nm (A260/A280) pri čemu se smatra da ako je omjer apsorbancija (A260/A280) unutar raspona od 1,8 do 2 da je DNA čista. Ukoliko je DNA kontaminirana ostacima proteina i fenola, omjer apsorbancija (A260/A280) je manji od 1,8, dok kod kontaminacije s RNA omjer apsorbancija (A260/A280) je veći od 2.

3.5. Određivanje genotipova i kontrola kvalitete

Određivanje polimorfizama jednog nukleotida izvedeno je u laboratoriju GeneSeek, Neogene Genomics, Velika Britanija pomoću Illumina Infinium® OvineHD SNP čipa koji sadrži 606 000 markera, slika 14. Nakon genotipiziranja rezultati su bili podijeljeni u ukupno 4 Illumina final reporta (96 jedinki, 24 jedinki, 94 jedinki, 6 jedinki). Spajanje setova i kontrola kvalitete je provedena pomoću programa SNP & Variation Suite v8.7.0 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com). Prilikom uvoza genotipova u SVS program odabrano je „TOP“ čitanje SNP-ova kako bi se što lakše kasnije mogli spojiti s genotipovima preuzetih s javno dostupnih baza podataka. Svi SNP-ovi koji su imali stopu odaziva (GenCall score) manju od 0,8 izostavljeni su iz daljnjih analiza. Nakon toga setovi s genotipovima hrvatskih izvornih ovaca su mapirani na mapu ovčjeg genoma Oar4.0. Zatim su spojeni i provedena je kontrola kvalitete na način da su SNP-ovi bez pozicija i SNP-ovi pozicionirani na spolnim kromosomima i mitohondrijskoj DNA odbačeni. Također, iz daljnjih analiza isključeni su SNP-ovi kod kojih je nedostajalo više od 10% genotipova, zatim jedinke kojima je nedostajalo više od 5% SNP-ova. Dobiveni rezultati pretvoreni su u .ped i .map datoteke koje su se koristile za daljnje analize te su nazvani hrvatski set.

Set podataka hrvatskih izvornih ovaca spojen je sa setom dostupnih genotipova europskih ovaca na način da je prvo provjerena podudarnost u čitanju, zatim su genotipovi europskih ovaca mapirani na mapu Oar4.0 te su na kraju spojeni s genotipovima hrvatskih izvornih ovaca gdje su svi SNP-ovi koji se nisu nalazili u oba seta podataka izbačeni. Nakon spajanja provedena je kontrola kvalitete na isti način kao za genotipove hrvatskih ovaca. Dobiveni rezultati pretvoreni su u .ped i .map datoteke koje su se koristile za daljnje analize, a nazvani su europski set.

3.6. Genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Kako bi procijenili genetsku raznolikost i povezanost hrvatskih izvornih pasmina ovaca izračunata je opažena heterozigotnost (H_o), očekivana heterozigotnost (H_e), i inbriding koeficijent (F_{IS}) koristeći PLINK v1.9 softver, te F_{ST} između pasmina koristeći SNP & Variation Suite v8.7.0 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com). Kako bi

procijenili genetsku specifičnost hrvatskih izvornih pasmina ovaca u odnosu na europske pasmine, hrvatske pasmine ovaca su tretirane kao jedna metapopulacija, a europske pasmine kao druga metapopulacija. Između njih je izračunat F_{ST} za svaki SNP koristeći SNP & Variation Suite v8.7.0 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com)

3.7. Analiza strukture hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Analiza glavnih komponenti (PCA, engl. *Principal Component Analysis*) provedena je na oba seta podataka – hrvatskom i europskom. PCA analiza provedena je u programu R paketom „SNPRelate“ (Zheng i sur., 2012) za svaki set posebno te je vizualizirana pomoću paketa „ggplot“.

Filogenetski odnosi analizirani su korištenjem mreže Neighbor-Net temeljene na Nei genetskim udaljenostima (Nei, 1978) pomoću softvera SplitsTree4 (Huson i Bryant, 2006). Nei genetske udaljenosti izračunate su u R programu pomoću „stAMPP“ paketa (Pembleton i sur., 2013).

Za ispitivanje strukture populacije iz genotipskih podataka korištena je metoda grupiranja utemeljena na modelu STRUCTURE (Pritchard i sur., 2000). Određivanje najboljeg broja pretpostavljenih klastera (označen s K) izvedeno je pomoću programa R i paketa „pophelper“ (Francis, 2017). Vizualizacija rezultata izvedena je korištenjem web-alata CLUMPAK (Kopelman i sur., 2015). Podaci SNP čipa korišteni su za ispitivanje strukture populacije oba seta podataka.

Set podataka s hrvatskim pasminama ovaca prorijeđen je metodom pruninga veličine prozora 50, veličine koraka 5 i svih parova (r^2 , engl. *pairwise*) koji imaju LD od 0,1. Europski set podataka je također prorijeđen na isti način kao i hrvatski set. Korišten je model s pretpostavkom primjene i koreliranim frekvencijama alela za sva izvršenja STRUCTURE programa, sa sagorijevanjem (engl. *burn-in*) od 10^4 iteracija, nakon čega slijedi 10^5 MCMC iteracija. Proces se ponavljao 10 puta za svaku vrijednost K koja se, ovisno o setu, kretala od 1 do 10 za hrvatski, te od 1 do 30 za europski set podataka.

Određivanje odnosa između populacija i uzoraka migracija između populacija napravljeno je stablom maksimalnih vjerojatnosti korištenjem softvera Treemix (Pickrell i Pritchard, 2012). Program koristi alelne frekvencije kako bi utvrdio odnose između populacija konstruiranjem stabla. Stablo omogućava modeliranje razilaženja populacija kao kod tradicionalnih metoda prikaza stabla, no dodaje vrijednost indicirajući kretanje gena između populacija. Stablo je ukorijenjeno na muflonu (*Ovis musimon*), divljem srodniku ovaca. Prvo je izgrađeno stablo maksimalne vjerojatnosti populacija bez migracija. Zatim je

izgrađena filogenetska mreža za sve odabrane populacije, povećavajući na taj način događaje migracija do 15 migracija. Prilikom računanja korišteni su sljedeći parametri: - global, -se, -bootstrap, -k 1000. Zaostaci od odgovarajućih modela prema podacima vizualizirani su pomoću R skripte implementirane u Treemix softveru. Prilikom izračuna korištena su oba seta podataka.

3.8. Procjena konzervacijskog statusa hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Za procjenu konzervacijskog statusa populacija pomoću genotipskih podataka koriste se inbriding i efektivna veličina populacija.

Inbriding iz genomskih podataka računao se pomoću homozigotnih regija (ROH, engl. *Runs Of Homozygosity*). Homozigotne regije identificirane su za svaku jedinku zasebno koristeći softver SNP & Variation Suite v8.7.0 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com). Minimalni broj SNP-ova koji čine ROH postavljen je na 50, a određen je formulom koju su predložili Lencz i sur. (2007):

$$l = \frac{\ln \frac{\alpha}{n_s * n_i}}{\ln(1 - het)}$$

gdje je n_s broj SNP-ova po jednici, n_i broj jedinki, α postotak lažno pozitivnih ROH-ova (0,05 u ovom istraživanju) i het je prosječni broj heterozigotnih SNP-ova.

Zbog češće pojave LD-a na kraćim udaljenostima u podacima genotipiziranim s HD-čipom, ROH-ovi su uobičajeno češći na kraćim duljinama. Da bi se regija kvalificirala kao ROH segment definirana je minimalna duljina od 2 Mb. Kako bi se izbjegla nejednaka raspodjela SNP-ova u ROH-ovima, minimalna gustoća je postavljena na 1 SNP svakih 50 Kb, a maksimalni razmak između dva uzastopna SNP-a ne smije biti veći od 250 Kb. Prema duljini homozigotne regije definirano je 5 kategorija: >2 Mb, 2-4 Mb, 4-8 Mb, 8-16 Mb i >16 Mb. Broj dopuštenih heterozigotnih SNP-ova i SNP-ova koji nedostaju definiran je za svaku kategoriju. U tablici 2 prikazan je broj dozvoljenih heterozigota i SNP-ova koji nedostaju za svaku kategoriju.

Tablica 2. Uvjeti za određivanje ROH-ova prema kategorijama

Dozvoljen broj	ROH kategorija				
	>2 Mb	2-4 Mb	4-8 Mb	8-16 Mb	>16 Mb
Heterozigota	1	2	4	8	16
SNP-ova koji nedostaju	4	8	16	32	64

Genomski koeficijenti inbridinga (F_{ROH}) definiran je kao omjer dužine autosomalnog genoma u ROH-ovima i ukupne dužine autosomalnog genoma pokrivenog SNP-ovima. Prosječni F_{ROH} izračunat je za svaku pasminu i kategoriju ROH-a.

Efektivna veličina populacija određena je programom GONE (Santiago i sur., 2020) na temelju optimizacijske metode (genetske optimizacije za procjenu N_e) koja implementira genetske algoritme (Mitchell, 1998) u svrhu procjene nedavne demografske povijesti populacije pomoću genotipskih podataka danas živućih jedinki. Program se bazira na ideji da neravnoteža vezanih gena (LD, engl. *linkage disequilibrium*) između parova SNP-ova na različitim genetskim udaljenostima daje različitu informaciju o efektivnoj veličini populacije u različitim točkama vremena u prošlosti. Za procjenu efektivne veličine populacije hrvatskih izvornih pasmina ovaca korišteni su unaprijed postavljeni parametri programa.

Efektivna veličina populacija određena je i SNeP v.1.1 softverom (Barbato i sur., 2015) kako bi bili usporedivi s drugim autorima. Ova metoda bazira se na povezanosti varijance LD-a i efektivne veličine populacije uz prisutnost mutacija kako bi se procijenila efektivna veličina populacija. Uzimajući u obzir sve navedeno efektivna veličina populacije softverom SNeP se procjenjuje iz LD-a koristeći izraz Corbina i sur. (2012):

$$N_{T(t)} = (4f(c_t))^{-1} \left(E[r_{adj}^2 | c_t]^{-1} - \alpha \right)$$

gdje je $N_{T(t)}$ efektivna veličina populacija prije t generacija izračunata kao $t = (2f(c_t))^{-1}$ prema Fariellu i sur. (2014), c_t je stopa rekombinacije za specifične fizičke udaljenosti između SNP-ova procijenjena prema Svedu i Feldmanu (1973), r_{adj}^2 je vrijednosti LD-a s korekcijom veličine uzorka i α je korekcija za pojavu mutacija.

4. REZULTATI

4.1. Kvaliteta i čistoća DNA

Provjerom kvalitete DNA na gel elektroforezi utvrđeno je da je DNA kod svih uzoraka ovaca i muflona netaknuta. Svjetlosni signal je bio zadovoljavajući.

Prosječna koncentracija DNA je bila 30 ng/μl, najveća koncentracija je bila 136 ng/μl, najmanja 6 ng/μl. Čistoća DNA je u prosjeku bila 1,8 što predstavlja idealnu čistoću. Najniža vrijednost čistoće DNA bila je 1, dok je najviša vrijednost bila 2.1. U prilogu 3 tablično su prikazani parametri procjene čistoće DNA, a u prilogu 4 su fotografski zapisi kvalitete DNA.

4.2. Genotipizacija i kontrola kvalitete

Nakon provedenog genotipiziranja u hrvatskom setu podataka bilo je prisutno 210 ovaca i 10 muflona, te ukupno 606 000 SNP-ova. Primjenom parametra kontrole iz seta su izbačene dvije ovce i 135 038 SNP-ova te je konačni set podatka hrvatskih ovaca sadržavao 208 ovaca, 10 muflona i 470 962 SNP-ova. Set podataka koji je korišten iz rada Cao i sur. (2020) sadržavao je 606 000 SNP-ova i 85 ovaca, dok je set preuzet sa Dryad depozitorija (www.dryad.com) sadržavao ukupno 432 285 SNP-ova i 271 ovce. Nakon spajanja dodatnih podataka s hrvatskim setom te ponovne kontrole kvalitete konačni europski set je sadržavao 348 968 SNP-ova i 574 ovce.

4.3. Genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Glavne genetske karakteristike hrvatskih izvornih pasmina ovaca se nalaze u tablici 3. Kod svih pasmina očekivana heterozigotnost je bila veća od opažene heterozigotnosti, osim kod dalmatinske pramenke gdje su očekivana i opažena heterozigotnost bile jednake. Ukupna prosječna vrijednost opažene heterozigotnosti bila je 0,354, dok je prosječna očekivana heterozigotnost bila 0,376. Unutar pasmina prosječna opažena heterozigotnost je varirala od 0,337 kod rapske ovce do 0,346 kod dalmatinske pramenke. Prosječna očekivana heterozigotnost unutar pasmina kretala se od 0,336 kod istarske ovce do 0,348 kod dalmatinske pramenke. Ukupni prosječni inbriding za sve populacije iznosio je 0,005. Inbriding koeficijent (F_{IS}) varirao je od -0,017 kod istarske ovce do 0,022 kod rapske ovce.

Tablica 3. Genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Pasmina	$F_{IS} \pm SE$	$H_o \pm SE$	$H_e \pm SE$
Creska ovca	0.002 ± 0.011	0.340 ± 0.004	0.341 ± 0.000
Dalmatinska pramenka	0.004 ± 0.008	0.346 ± 0.003	0.348 ± 0.000
Dubrovačka ovca	0.005 ± 0.015	0.339 ± 0.005	0.341 ± 0.000
Istarska ovca	-0.017 ± 0.011	0.342 ± 0.004	0.336 ± 0.000
Krčka ovca	0.001 ± 0.012	0.340 ± 0.004	0.340 ± 0.000
Lička pramenka	0.005 ± 0.012	0.345 ± 0.004	0.347 ± 0.000
Paška ovca	0.016 ± 0.008	0.339 ± 0.003	0.345 ± 0.000
Rapska ovca	0.022 ± 0.018	0.337 ± 0.006	0.345 ± 0.000

F_{IS} – koeficijent inbridinga; H_o – opažena heterozigotnost; H_e – očekivana heterozigotnost

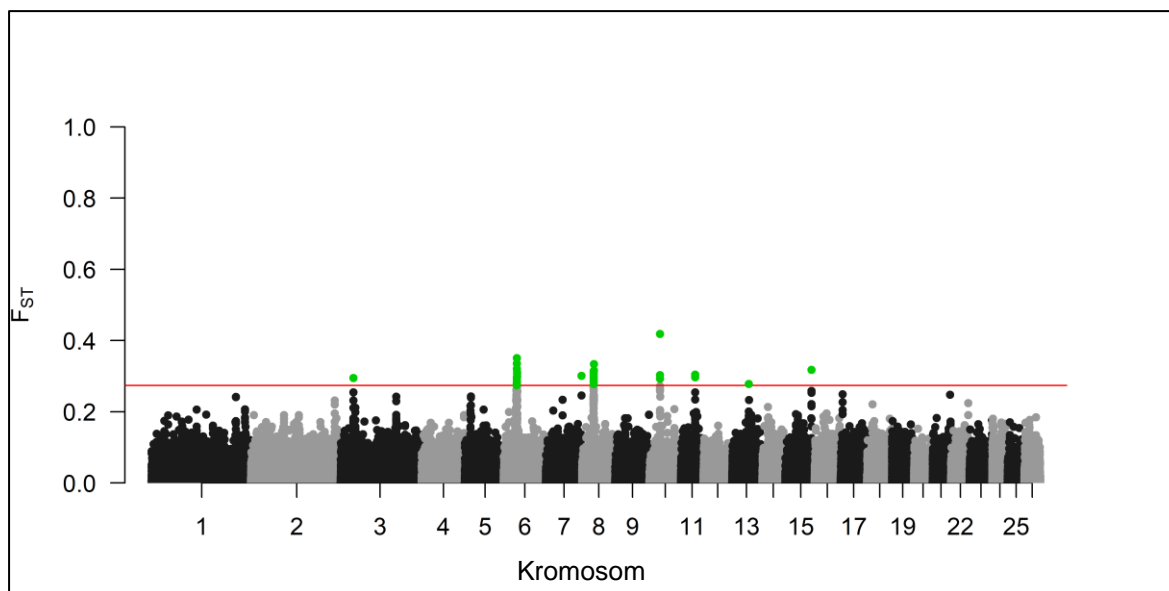
Fiksacijski indeks F_{ST} upotrijebljen je kako bi se izmjerila homogenost uzoraka između dvije pasmine uzrokovane genetskom strukturom. F_{ST} je varirao od 0,003 između dalmatinske i ličke pramenke do 0,065 između istarske ovce i dubrovačke ovce, tablica 4. Najudaljenija od svih pasmina bila je istarska ovca s najvećom MF_{ST} vrijednostima.

Tablica 4. F_{ST} vrijednosti između hrvatskih autohtonih ovaca

Pasmina	DPS	DRS	ISS	PIS	RIS	LPS	KIS	MF_{ST}
DPS								0,022
DRS	0,026	.						0,044
ISS	0,040	0,065	.					0,048
PIS	0,015	0,039	0,041	.				0,025
RIS	0,016	0,040	0,040	0,011	.			0,025
LPS	0,003	0,029	0,044	0,020	0,021	.		0,027
KIS	0,026	0,053	0,050	0,025	0,024	0,033	.	0,035
CIS	0,030	0,055	0,053	0,022	0,020	0,036	0,034	0,036

DRS – dubrovačka ovca, ISS – istarska ovca, PIS – paška ovca, RIS – rapska ovca, LPS- lička pramenka, KIS – krčka ovca, CIS – creska ovca

Kako bi se procijenila jedinstvenost hrvatskih izvornih pasmina ovaca izračunate su F_{ST} vrijednosti za svaki SNP između dvije meta populacije. Najvećih 35 F_{ST} vrijednosti, što odgovara 0,01% najboljih F_{ST} vrijednosti, proglašeni su pokazateljima jedinstvenosti genoma hrvatskih izvornih pasmina ovaca u odnosu na europske pasmine, graf 1. SNP-ovi koji su se nalazili jedan pored drugoga tretirani su kao jedan SNP, te je na temelju toga određeno osam regija specifičnih za hrvatske izvorne pasmine ovaca koje se nalaze na kromosomima 3, 6, 7, 8,10, 11, 13 i 15.



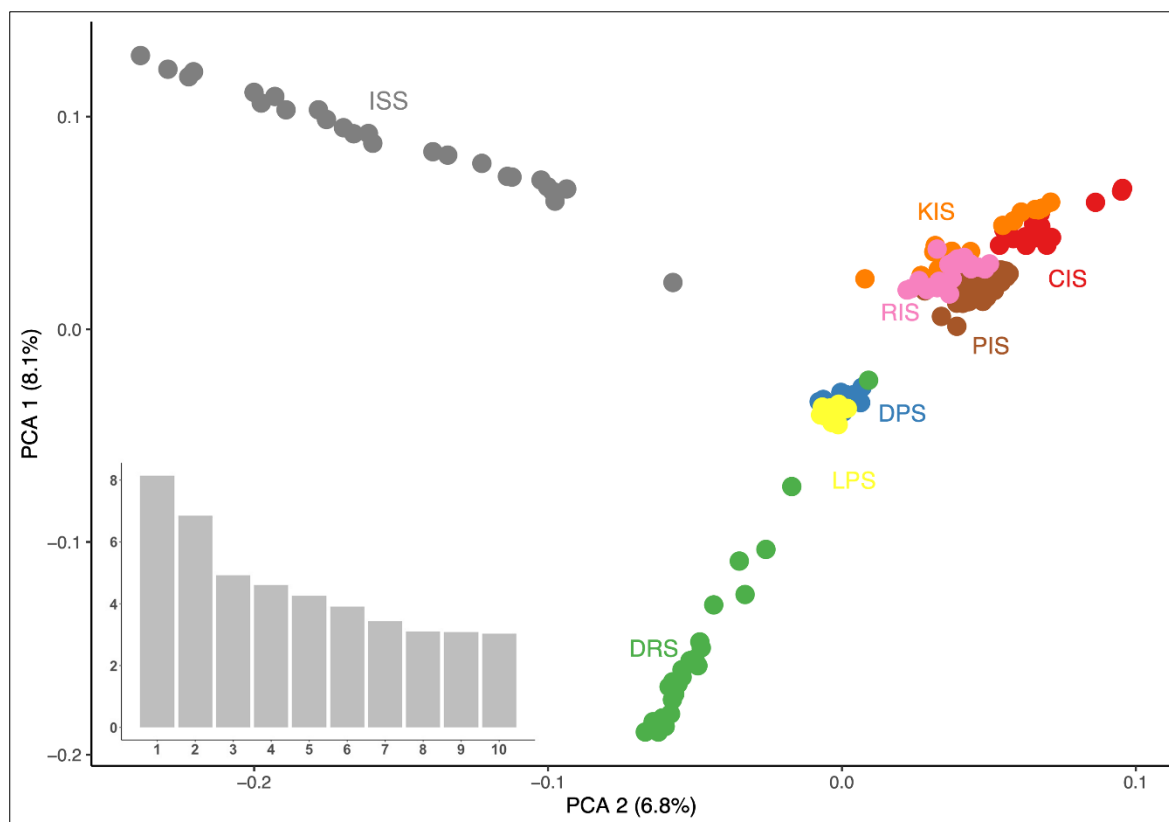
Graf 1. Manhattan plot F_{ST} vrijednosti izračunate za svaki SNP između metapopulacije hrvatskih izvornih pasmina ovaca i europskih pasmina ovaca
Signifikantni SNP-ovi su označeni zelenom bojom

4.4. Multivarijatne analize

4.4.1. Analiza glavnih komponenti (PCA)

Analiza glavne dvije komponente dobivena za hrvatski set podataka prikazana je grafom 2. Postotak objašnjene varijabilnosti (y os) s prvih deset komponenti (x os) prikazan je grafom u lijevom donjem kutu. Prve dvije komponente objašnjavaju ukupno 14,9% ukupne varijabilnosti što objašnjava znatnu genetsku raznolikost. Obzirom da preostale komponente objašnjavaju znatno manje varijabilnosti prikazujemo PCA za prve dvije komponente.

Prva komponenta PCA odvojila je dubrovačku ovcu od ostalih pasmina objašnjavajući 8,1% ukupne varijabilnosti. Istarska ovca je odijeljena od ostatka pasmina drugom komponentom objašnjavajući 6,8% ukupne varijabilnosti. Dubrovačka i lička pramenka na PCA grafu su se grupirale skupa, jednako kao i paška, rapska, krčka i creska ovca.

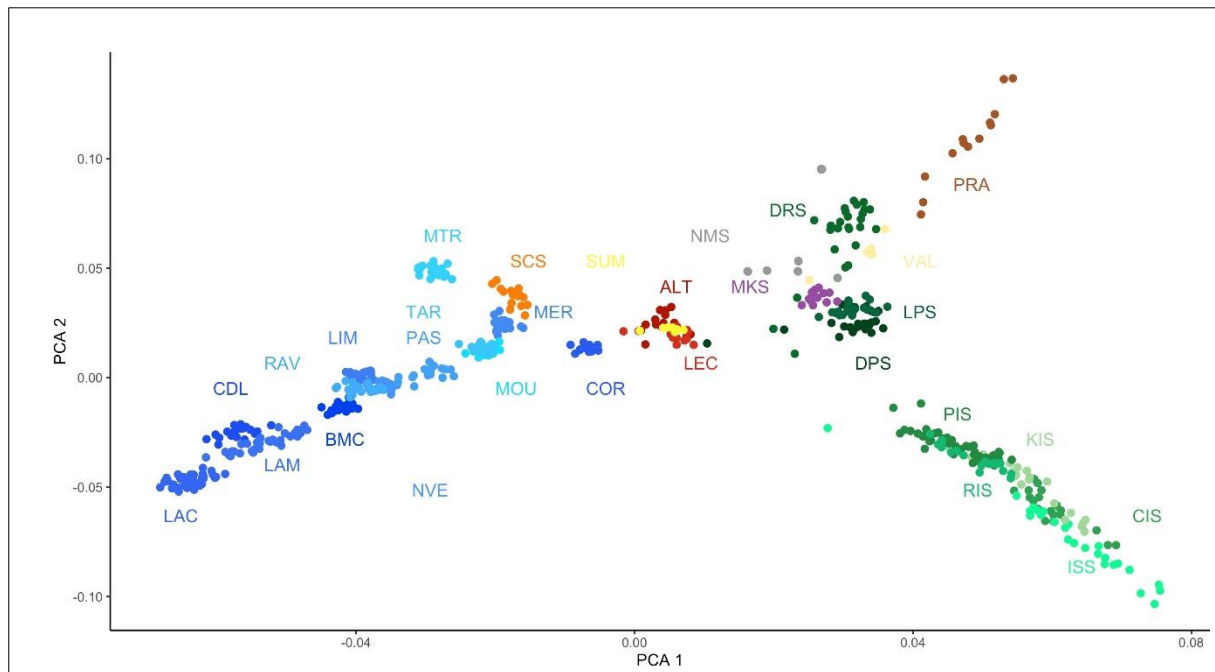


Graf 2. Analiza glavnih komponenti (PCA) hrvatskog seta podataka

DRS – dubrovačka ovca, LPS – lička pramenka, DPS – dalmatinska pramenka, PIS – paška ovca, RIS – rapska ovca, CIS – creska ovca, KIS – krčka ovca, ISS – istarska ovca

Analiza glavnih komponenti dobivena iz genotipskih podataka za europski set podataka prikazana je grafom 3. Postotak objašnjene varijabilnosti (y os) s prvih deset komponenti (x os) prikazan je grafom u prilogu 5. Prve dvije komponente objašnjavaju ukupno 14,35% ukupne varijabilnosti. Obzirom da druga, treća i četvrta komponenta objašnjavaju podjednak postotak varijabilnosti ovdje prikazujemo prve dvije komponente, dok se u prilogu nalaze odnosi prve komponente s trećom (prilog 6) i prve komponente s četvrtom komponentom (prilog 7).

PCA pokazuje da je prva komponenta odvojila pramenke od ostalih europskih pasmina ovaca objašnjavajući 9,09% ukupne varijabilnosti. Druga komponenta odvojila je istarsku ovcu, pašku ovcu, krčku ovcu, rapsku ovcu i cresku ovcu od ostalih pramenki objašnjavajući 5,26% genetske udaljenosti. Treća i četvrta komponenta su odvojile francuske pasmine *causse du lot* (CDL) i *manech tête rouge* (MTR) koje se uzgajaju na alpskim predjelima Francuske. Dalmatinska pramenka, lička pramenka i dubrovačka ovca su se grupirale s ukrajinskom (MKS), sjeverno makedonskom (NMS), češkom (VAL) i srpskom pramenkom (PRA). Češka sumavska ovca (SUM) se grupirala s talijanskim pasminama ovaca i one se nalaze kao poveznica između balkanskih pramenki i zapadnoeuropskih ovaca. Španjolska churra ovca (SCS) najbliža je merino ovcu (MER).

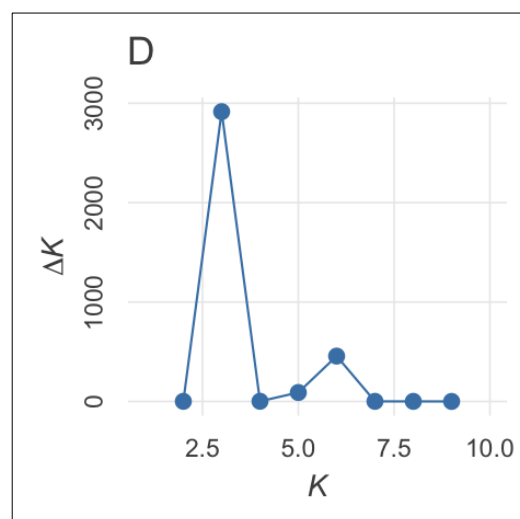


Graf 3. Analiza glavnih komponenti za europski set podataka

Države iz kojih pasmine dolaze predstavljene su bojama: Hrvatska – zelena (DRS, LPS, DPS, PIS, KIS, RIS, CIS, ISS), Ukrajina – ljubičasta (MKS), Srbija – smeđa (PRA), Češka – žuta (SUM, VAL), Sjeverna Makedonija – siva (NMS), Italija – crvena (ALT, LEC), Španjolska – narančasta (SCS), Francuska – plava (LAC, LAM, BMC, CDL, NVE, RAV, LIM, MOU, PAS, TAR, COR, MER, MTR). Objašnjenja oznaka pasmina nalazi se u tablici priloga 2.

4.4.2. Analiza strukture populacije

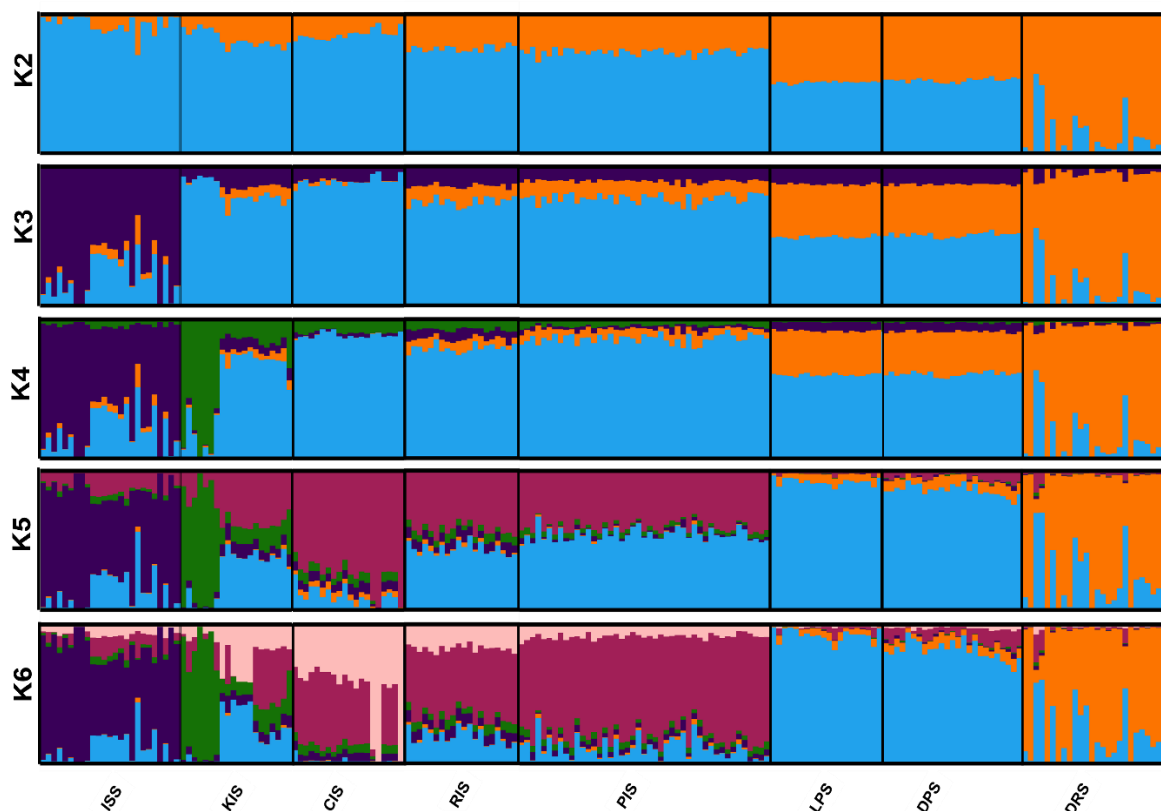
Analiza strukture populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca procijenjena je metodom STRUCTURE za do 10 teoretskih populacija na ukupno 83 795 SNP-ova. Najinformativnija K vrijednost procijenjena Evanno metodom delta K je iznosila tri (graf 4). Rezultati od K= 2 do K=6 prikazani su slikom 21.



Graf 4. Grafički prikaz delta K vrijednosti za hrvatski set podataka

Na STRUCTURE grafikonu svaka jedinka predstavljena je jednim stupcem, a broj boja na grafikonu jednak je broju pretpostavljenih populacija (K). Udio boje u pojedinoj jedinki predstavlja proporciju genotipske pripadnosti određenoj skupini. Pregledom rezultata za pojedine K vrijednosti vidljivo je da se na K=2 odvajaju dalmatinska i lička pramenka od creske, krčke, paške i rapske ovce. Dubrovačka ovca se izdvojila potpuno samostalno. Povećanjem K vrijednosti na 3, istarska ovca pokazuje različitu genetsku osnovu te dolazi do odvajanja istarske ovce od ostalih pasmina. Kod K=5, dalmatinska i lička pramenka stvaraju grupu koja je jasno odvojena. Te dvije pasmine se ne odvajaju ni na K=10, maksimalnom broju pretpostavljenih grupa za ovaj set podataka. Također na K=5 dolazi do odvajanja creske ovce od ostalih hrvatskih izvornih pasmina. Kod K=6 dolazi do razdvajanja populacije krčke ovce na tri subpopulacije od koji su dvije genetički zasebne, a jedna dijeli dio genoma pramenke.

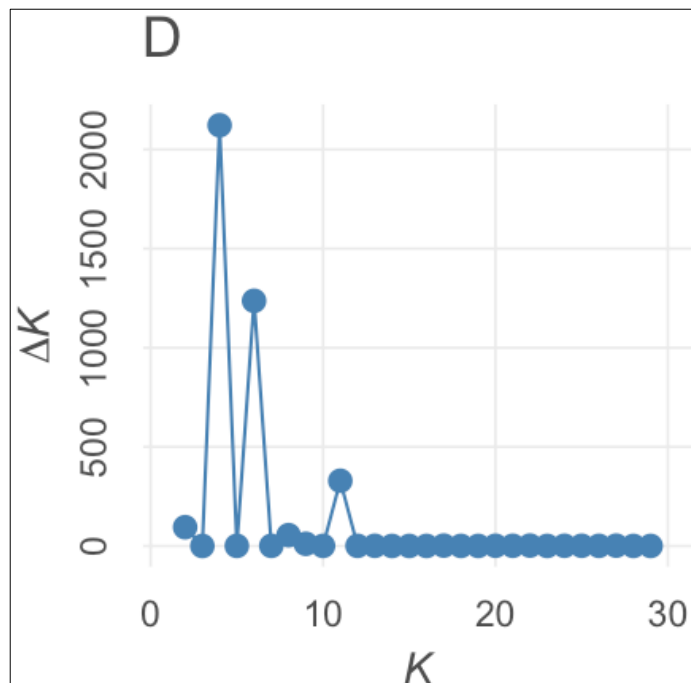
Dalmatinska i lička pramenka genetski su gotovo identične pasmine, jednako kao i paška i rapska ovca.



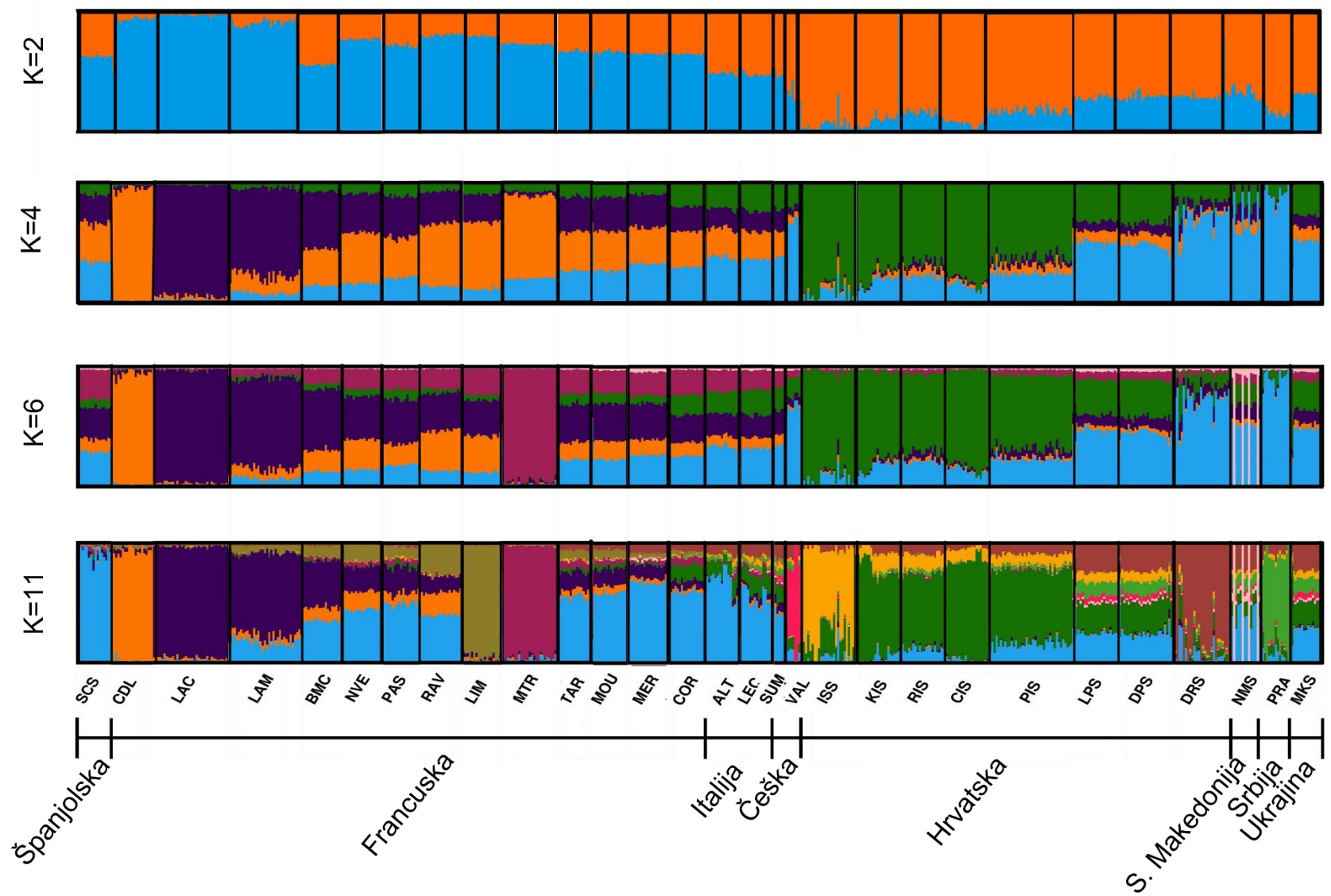
Slika 21. Grafički prikaz rezultata STRUCTURE analize za hrvatske izvorne pasmine ovaca. Prikazani su rezultati za K= 2 - 6. DRS – dubrovačka ovca, LPS – lička pramenka, DPS – dalmatinska pramenka, PIS – paška ovca, RIS – rapska ovca, CIS – creska ovca, KIS – krčka ovca, ISS – istarska ovca

Analiza strukture populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca zajedno s europskim populacijama procijenjena je metodom STRUCTURE za do 30 ancestralnih populacija na ukupno 104 623 SNP-ova.

Najinformativnije K vrijednosti ($K = 4$, $K = 6$ i $K = 11$) procijenjene su postupkom Evanno delta K (graf 5), a STRUCTURE grafikon koji se temelji na tim K vrijednostima prikazan je na slici 22. Prikazom za $K=2$ vidljiva je podjela populacija na zapadnoeuropske pasmine ovaca i balkanske pramenke. Prve pasmine koje se odvajaju su francuske pasmine *causse du lot* (CDL) i *manech tête rouge* (MTR), ($K=3$, prilog 8). Daljnja odvajanja pasmina su se događala kako slijedi, *lacune* i podjela pramenki na dvije grupe gdje jednu grupu čine *creska*, *krčka*, *istarska*, *paška*, i *rapska* ovca, a drugu grupu sjeverno makedonska pramenka, *dubrovačka* ovca, *dalmatinska* pramenka, *lička* pramenka, *srpska* pramenka, *valachian* ovca dogodila se na $K=4$. Srpska pramenka se odvojila na $K=5$, *churra* ovca, *limousin* i *dubrovačka* ovca se odvajaju na $K=9$, *rava* ovca na $K=10$, *istarska* ovca i *valachian* na $K=11$. Odvajanje talijanskog klustera odvija se na $K=14$ dok se *altamura* i *leccese* razdvajaju tek na $K=220$. *Noire du velay* se odvajaju na $K=16$ i *merino* ovca na $K=21$. Grafovi za K vrijednosti koje nisu prikazane na grafu 5 prikazane su u prilogu 8.



Graf 5. Grafički prikaz delta K vrijednosti za populacije europskog seta podataka

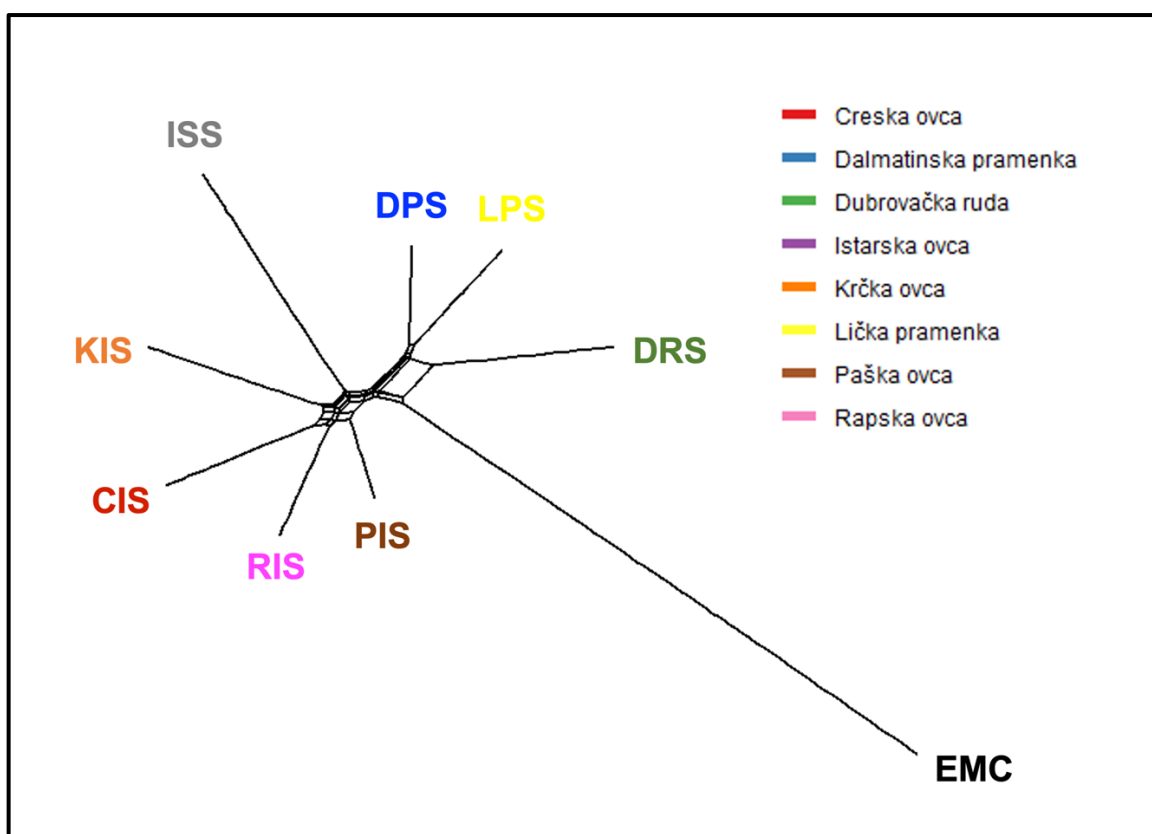


Slika 22. Grafički prikaz rezultata STRUCTURE analize za europski set. Prikazani su rezultati za K= 2, 4, 6 i 11.

4.5. Filogenetski odnosi hrvatskih izvornih pasmina ovaca

4.5.1. Nei genetske distance prikazane Neighbour – Net mrežom

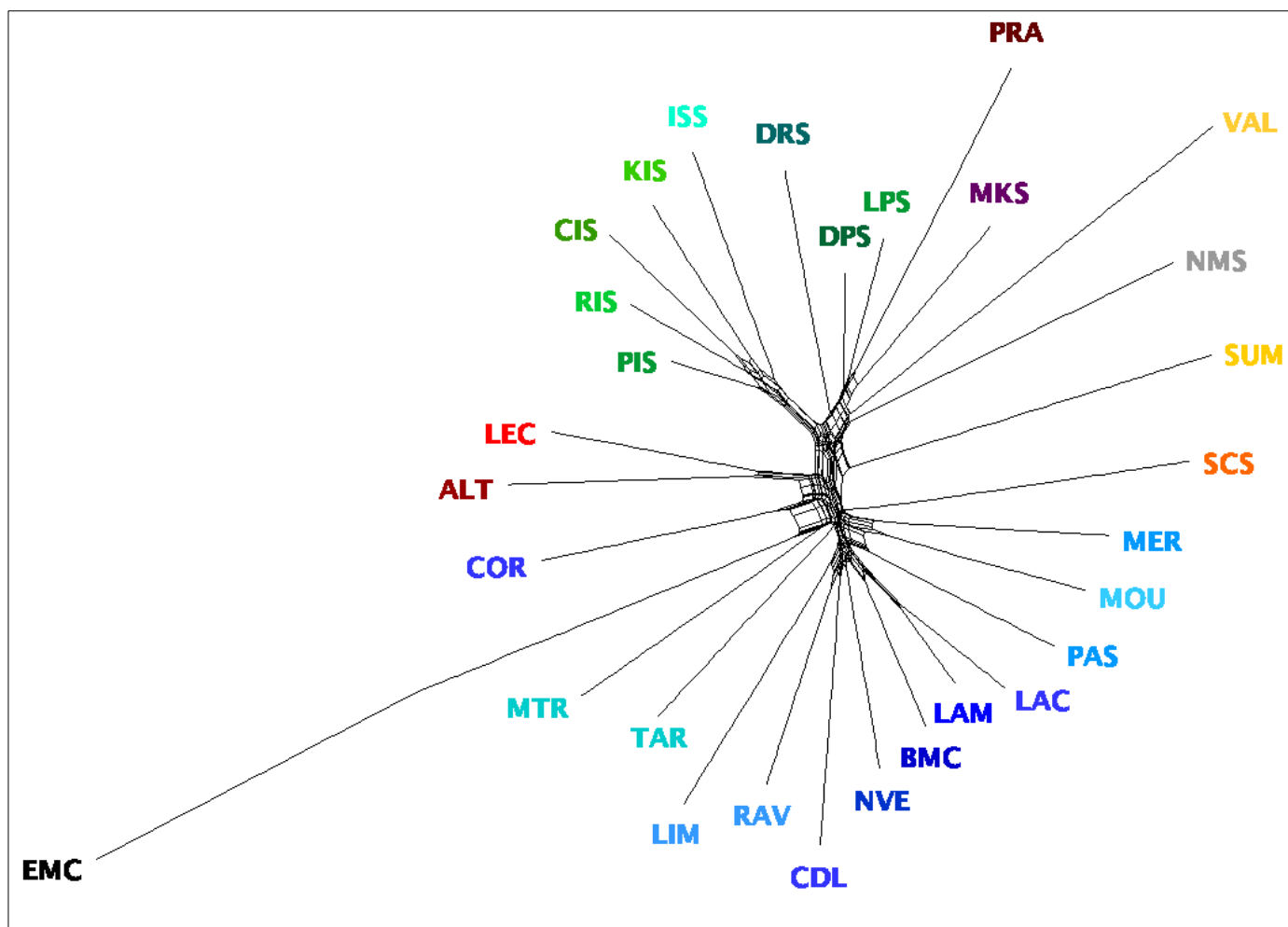
Izračunate Nei genetske udaljenosti između pasmina hrvatskih izvornih ovaca prikazane su Neighbour – Net mrežom (slika 23.). Na mreži je prikazana prisutnost grupiranja paške ovce, rapske ovce, creske ovce, krčke ovce i istarske ovce na jednu granu, a dalmatinske pramenke, ličke pramenke i dubrovačke ovce na drugu granu. Muflon je zauzeo središnju poziciju na grafu s najduljom granom sugerirajući najveću genetsku udaljenost od ostalih pasmina.



Slika 23. Nei distance hrvatskih izvornih pasmina ovaca prikazane Neighbour – Net mrežom pomoću SplitsTree softvera

Rezultati analize genetske udaljenosti ovaca u koju su uključene i europske pasmine ovaca prikazana je slikom 24. Talijanske pasmine altamurana i lecese zajedno s češkom sumavska ovcom zauzele su centralnu poziciju na grafu i dijele ostale pasmine na istočnoeuropske i zapadnoeuropske ovce. Sumavaska se nalazi u grupi s pramenkama dok su altamurana i lecese genetski bliže zapadnoeuropskim pasminama. Hrvatske izvorne pasmine ovaca se nalaze u grupi istočnoeuropskih ovaca zajedno sa srpskom pramenkom, sjeverno-makedonskom pramenkom, češkom valachian ovcom i ukrajinskom planinskom

karpatskom ovcom. Te pasmine zajedno čine grupu balkanskih pramenki. Muflon i ovdje pokazuje najveću genetsku udaljenost, a smjestio se najbliže corse ovci porijeklom s otoka Korzike.

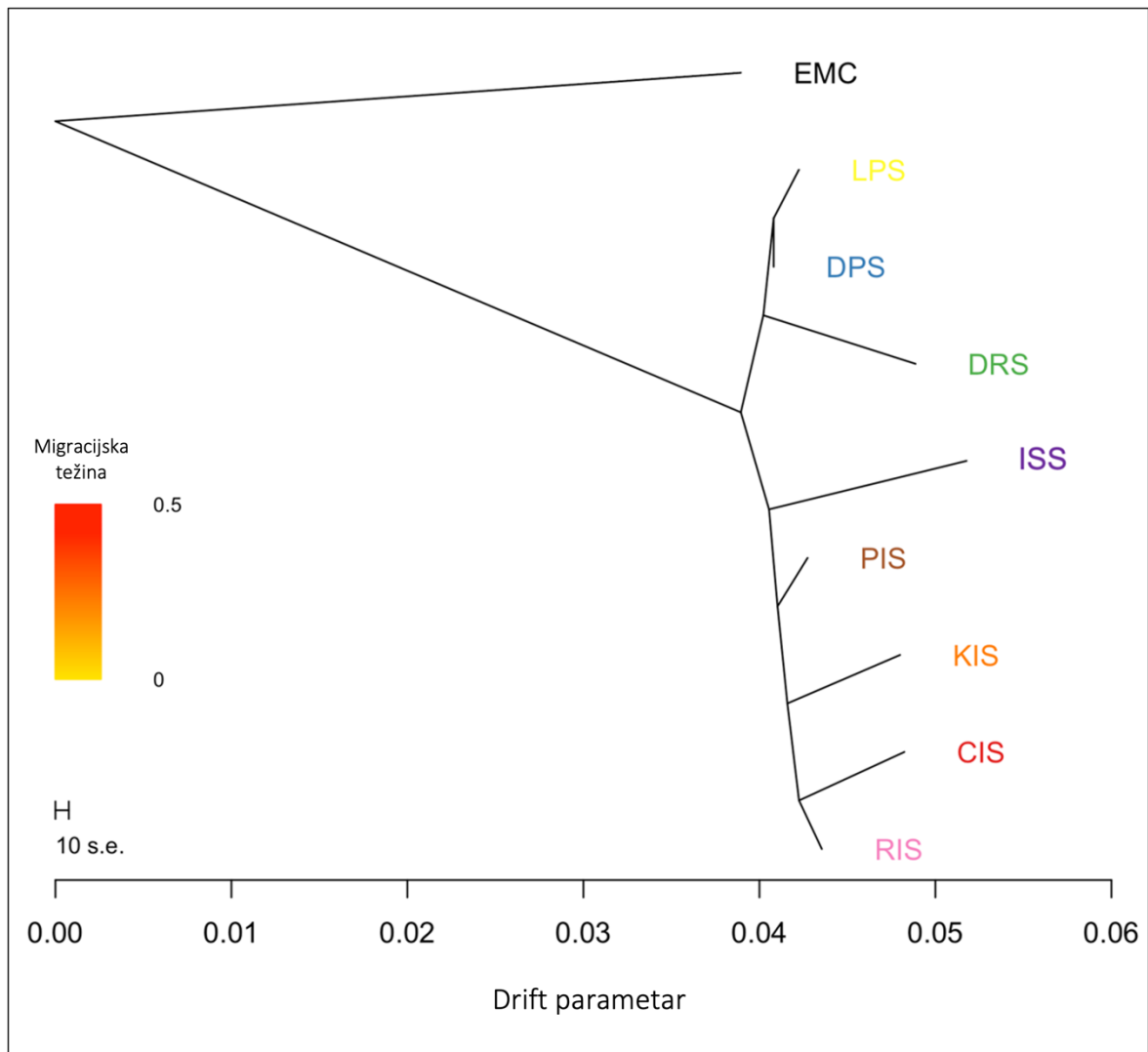


Slika 24. Nei distance predstavljene Median-Joining mrežom u Splitstree programu s opcijom povećala

Države iz kojih pasmine dolaze predstavljene su bojama: Hrvatska – zelena (DRS, LPS, DPS, PIS, KIS, RIS, CIS, ISS), Ukrajina – ljubičasta (MKS), Srbija – smeđa (PRA), Češka – žuta (SUM, VAL), Sjeverna Makedonija – siva (NMS), Italija – crvena (ALT, LEC), Španjolska – narančasta (SCS), Francuska – plava (LAC, LAM, BMC, CDL, NVE, RAV, LIM, MOU, PAS, TAR, COR, MER, MTR). Objašnjenja oznaka pasmina nalazi se u tablici priloga 2.

4.5.2. Filogenetsko stablo

Filogenetsko stablo konstruirano za hrvatski set podataka prikazano je slikom 25. Za outgrupu je korišten muflon (*Ovis musimon*). Stablo maksimalnih vjerojatnosti pokazuje da su lička i dalmatinska pramenka najbliže povezane te da zajedno s dubrovačkom ovcom tvore jednu granu. Drugu granu tvore istarska ovca, paška ovca, rapska ovca, creska ovca i krčka ovca.

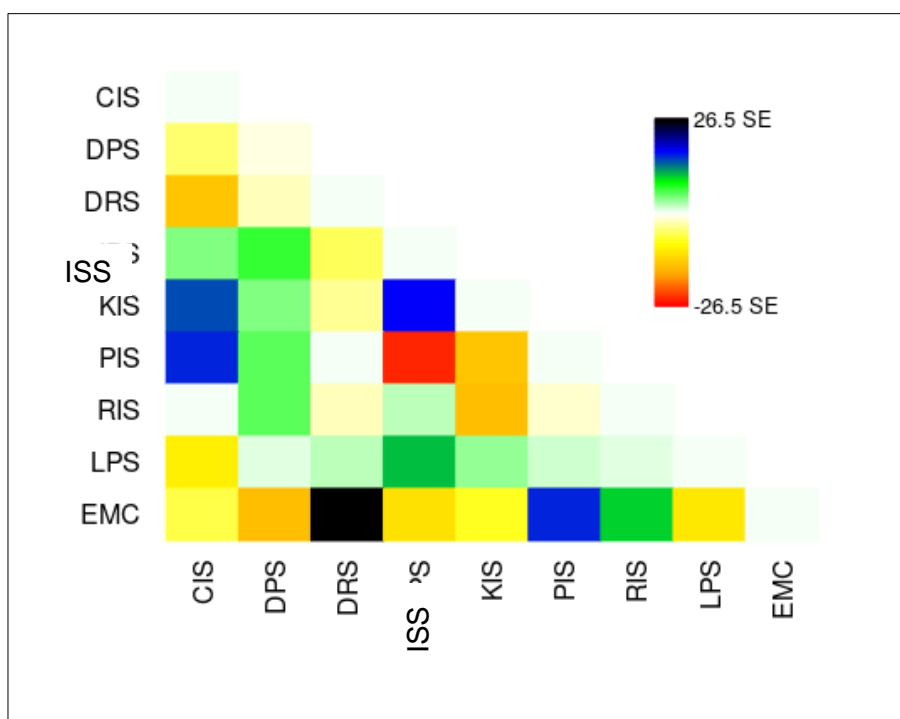


Slika 25. Stablo maksimalne vjerojatnosti hrvatskih izvornih pasmina

DRS – dubrovačka ovca, LPS – lička pramenka, DPS – dalmatinska pramenka, PIS – paška ovca, RIS – rapska ovca, CIS – creska ovca, KIS – krčka ovca, ISS – istarska ovca, EMC – europski muflon

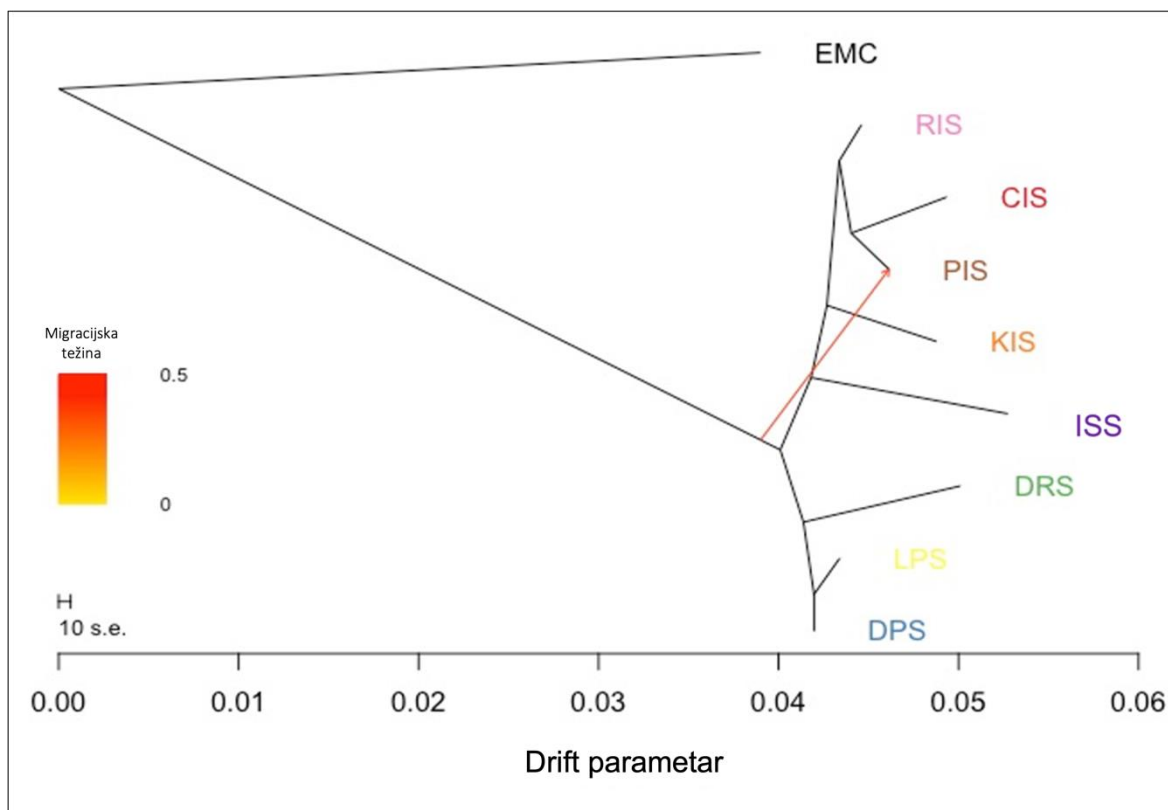
Heat map ostataka iz stabla prikazan je na slici 26. Parovi s visokim vrijednostima ostataka su kandidati za migracijske događaje. Obzirom da je heat map ostataka pokazao

vrlo visoke vrijednosti ostataka za pojedine pasmine izračunata su i stabla s vjerojatnošću 1–15 migracija.



Slika 26. Heat map ostataka stabla maksimalne vjerojatnosti hrvatskih izvornih pasmina ovaca
 DRS – dubrovačka ovca, LPS – lička pramenka, DPS – dalmatinska pramenka, PIS – paška ovca, RIS – rapska ovca, CIS – creska ovca, KIS – krčka ovca, ISS – istarska ovca, EMC – europski muflon

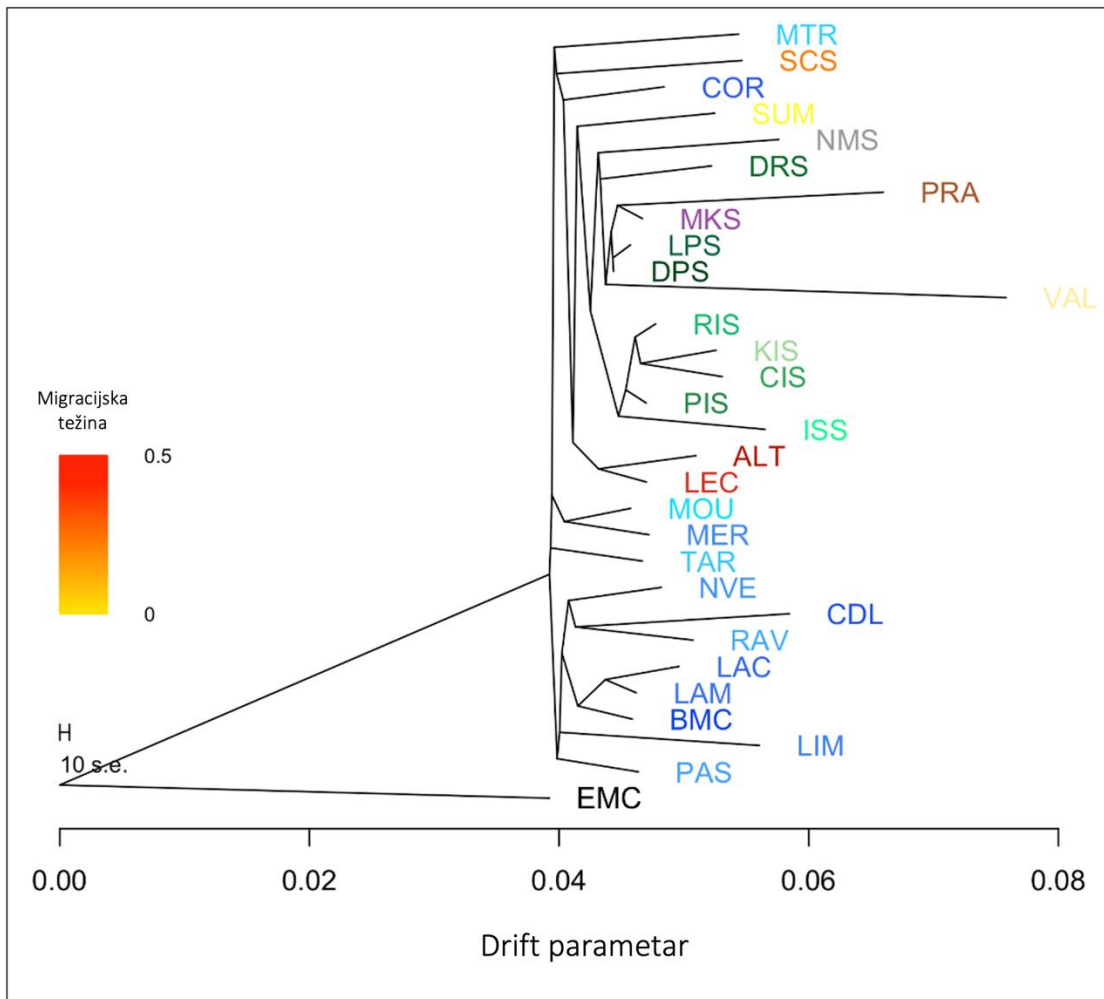
Najviša ΔM vrijednost smatra se najvjerojatnijim brojem migracija (prilog 9), pa je također nacrtano stablo s najvjerojatnijom jednom migracijom, slika 27. Stablo s migracijama filogenetski je identično stablu maksimalne vjerojatnosti i pretpostavlja migraciju iz korijena zajedničkog genoma muflona i ovaca u pašku ovcu. Migracijska težina predstavljena gradiuiranom crvenom bojom označava proporciju predaka koji dolaze s ruba migracije. Obzirom da jednom migracijom nisu objašnjeni svi ostaci grafa u prilogu 10 prikazano je i stablo s četiri migracije. Migracija s najvećom težinom ide iz muflona u dubrovačku rudu i rapsku ovcu te iz dalmatinske pramenke u pašku ovcu. Migracija s najmanjom težinom predstavlja migraciju ličke pramenke u istarsku ovcu.



Slika 27. Stablo maksimalne vjerojatnosti hrvatskih izvornih pasmina ovaca s jednom migracijom
 DRS – dubrovačka ovca, LPS – lička pramenka, DPS – dalmatinska pramenka, PIS – paška ovca, RIS – rapska ovca, CIS – creska ovca, KIS – krčka ovca, ISS – istarska ovca

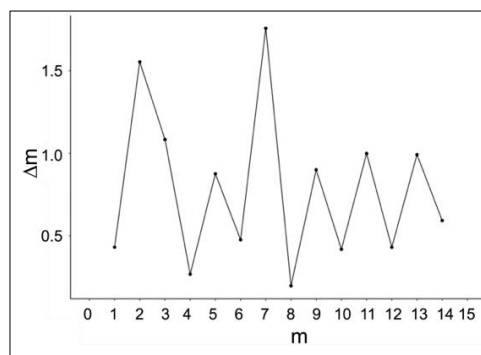
Filogenetsko stablo prikazano za europski set podataka ukorijenjeno je također na muflonu (*Ovis musimon*), divljem srodniku ovaca i prikazano slika 28.

Na stablu se formiralo pet grana. Pasmine tarasconnaise i manech du velay svaka tvore jednu granu. Preostale tri grane čine grupe od više pasmina. Dvije grane tvore francuske pasmine ovaca od koji su se merinos d'arles i mourerous odvojile od ostalih francuskih pasmina. Posljednja grana u kojoj se nalaze hrvatske pasmine ovaca formirana je od 5 grupa. U korijenu grane nalazi se španjolska churra ovca. Dalje se grana dijeli na dio u kojem se nalazi corse ovca te grupe talijanskih leccese i altamurana ovaca. Iz korijena talijanskih ovaca dalje se odvaja sumavska ovca koja čini korijen za podjelu balkanskih pramenki u dvije grupe. U jednoj grupi nalaze se hrvatske izvorne pasmine creska ovca, paška ovca, rapska ovca, krčka ovca, a istarska ovca se smjestila u korijen te grupe. U drugoj grupi nalaze se hrvatske izvorne pasmine dalmatinska pramenka i lička pramenka u jednoj grani, zatim srpska pramenka i mountain carpatian ovca u drugoj grani. Dubrovačka ovca se približila sjeverno makedonskoj pramenki, a sumavska i valachian svaka stvaraju svoju granu.



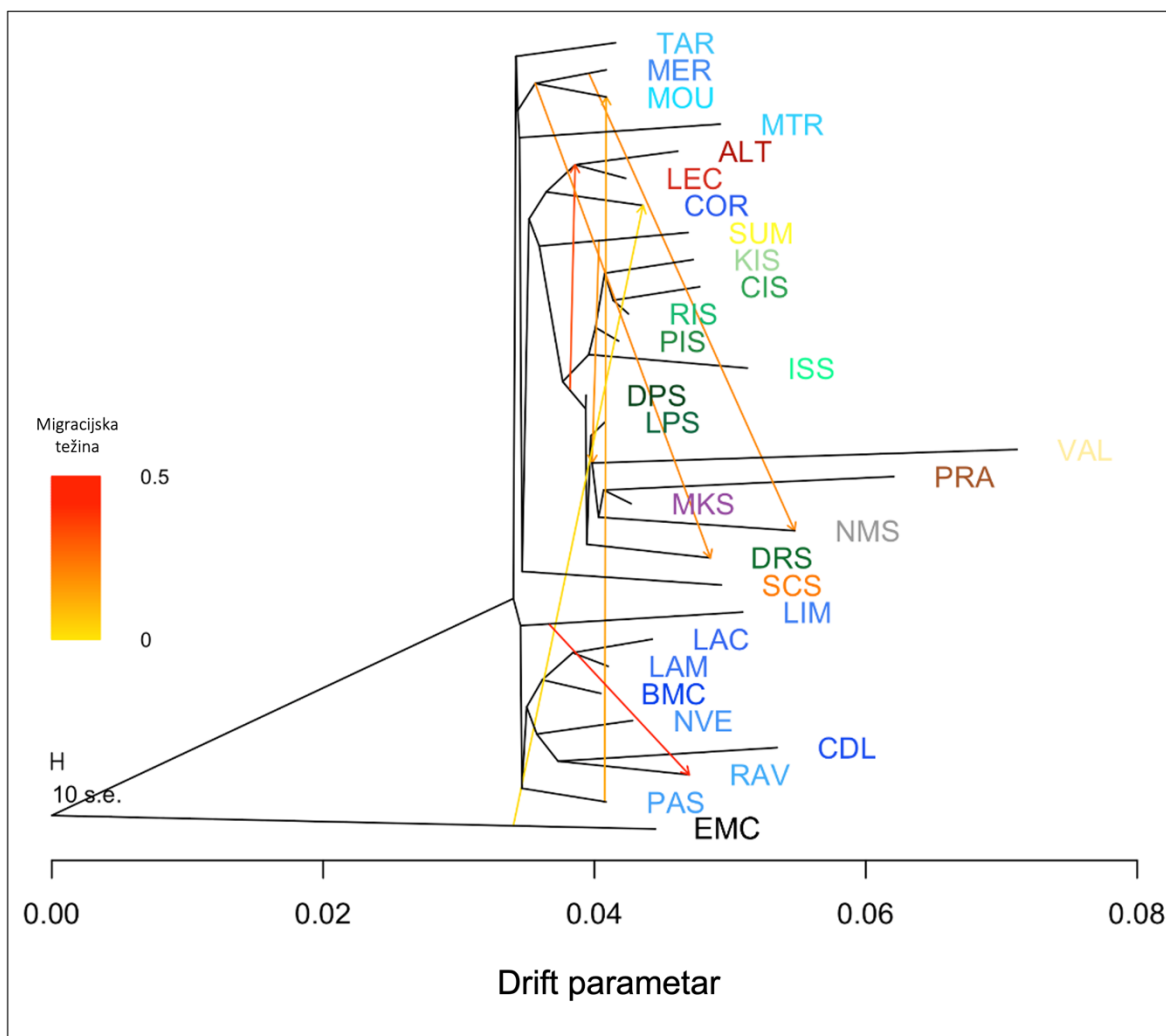
Slika 28. Stablo maksimalne vjerojatnosti prikazano za europski set podataka. Države iz kojih pasmine dolaze predstavljene su bojama: Hrvatska – zelena (DRS, LPS, DPS, PIS, KIS, RIS, CIS, ISS), Ukrajina – ljubičasta (MKS), Srbija – smeđa (PRA), Češka – žuta (SUM, VAL), Sjeverna Makedonija – siva (NMS), Italija – crvena (ALT, LEC), Španjolska – narančasta (SCS), Francuska – plava (LAC, LAM, BMC, CDL, NVE, RAV, LIM, MOU, PAS, TAR, COR, MER, MTR). Objašnjenja oznaka pasmina nalazi se u tablici priloga 2.

Na grafu 6 prikazan je optimalan broj migracija za europski set podataka. Obzirom da je najviša vrijednost Δm bila za sedam migracija, slikom 29 prikazano je stablo maksimalnih vjerojatnosti sa sedam migracija.



Graf 6. Prikaz optimalnog broja migracija za europski set podataka

Filogenetski na stablu sa sedam migracija dolazi do promjene kod corse ovce koja se sada nalazi u grupi s talijanskim altamura i leccese ovcama. Dvije migracije s najvećim migracijskim težinama su između korijena grane balkanskih kontinentalnih pasmina i korijena talijanskih pasmina, te između limousine i rava ovce. Ostale migracije su se dogodile između korijena francuskih merino ovaca i dubrovačke ovce, merino d'arles i makedonske pramenke, prealpes du sud i mourerous ovaca, sumavske i valachian ovce te muflona i corse ovce.

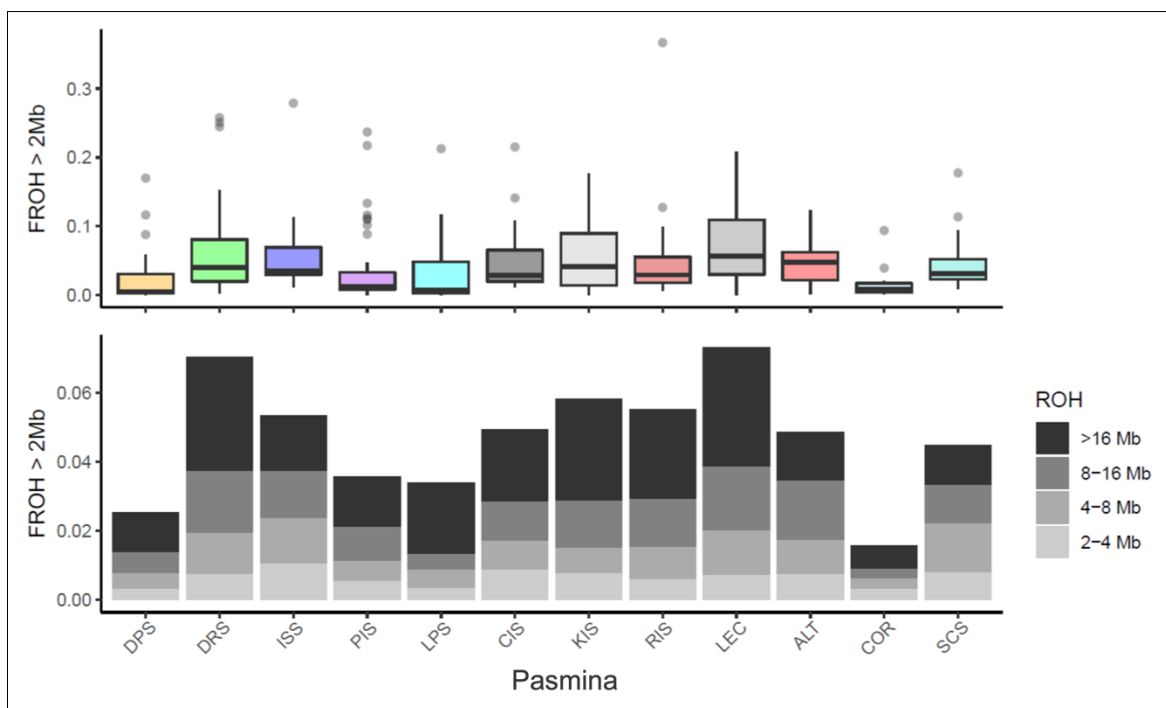


Slika 29. Neighbour-Joining stablo sa sedam migracija za europski set podataka
 Države iz kojih pasmine dolaze predstavljene su bojama: Hrvatska – zelena (DRS, LPS, DPS, PIS, KIS, RIS, CIS, ISS), Ukrajina – ljubičasta (MKS), Srbija – smeđa (PRA), Češka – žuta (SUM, VAL), Sjeverna Makedonija – siva (NMS), Italija – crvena (ALT, LEC), Španjolska – narančasta (SCS), Francuska – plava (LAC, LAM, BMC, CDL, NVE, RAV, LIM, MOU, PAS, TAR, COR, MER, MTR), muflon – crna (EMC). Objašnjenja oznaka pasmina nalazi se u tablici priloga 2.

4.6. Konzervacijski status hrvatskih izvornih pasmina ovaca

4.6.1. Genomski inbriding hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Ukupni genomski inbriding hrvatskih izvornih pasmina i tri odabrane pasmine iz europskog seta podataka (leccese, altamurana i corse) procijenjen za $ROH > 2$ Mb kao i ukupni genomski inbriding po kategorijama prikazani su slikom 30.



Slika 30. Genomski inbriding hrvatskih autohtonih pasmina ovaca i četiri europske pasmine. DRS – dubrovačka ovca, LPS – lička pramenka, DPS – dalmatinska pramenka, PIS – paška ovca, RIS – rapska ovca, CIS – creska ovca, KIS – krčka ovca, ISS – istarska ovca, LEC – leccese, ALT – altamurana, COR – corse, SCS – churra

ROH-ovi su pronađeni u svim pasminama, a najveći broj ROH-ova je pronađen u kratkim ROH segmentima. Utvrđena je značajna razlika u vrijednostima F_{ROH} -a između jedinki i između pasmina. Najveći $F_{ROH > 2Mb}$ prisutan je kod dubrovačke ovce i iznosio je 0,07. Jedinka s najvećim $F_{ROH > 2Mb}$ bila je rapska ovca (R186) kod koje je inbriding iznosio 0,367. Pasmina s najmanjim ukupnim koeficijentom inbridinga preko 2 Mb je dalmatinska pramenka ($F_{ROH > 2Mb} = 0,025$). Pregledom prikaza inbridinga po kategorijama vidljivo je da najveći udio ukupnog inbridinga kod svih pasmina ima kategorija >16 Mb, a najmanji udio inbridinga za kategoriju 2-4 Mb.

Najveća vrijednost F_{ROH} za kategoriju 2-4 Mb pronađena je kod istarske ovce ($F_{ROH 2-4Mb} = 0,010$) dok je dalmatinska pramenka imala najmanji $F_{ROH 2-4Mb}$ s vrijednosti od 0,002. Najveća $F_{ROH 4-8Mb}$ vrijednost od 0,013 procijenjena je za istarsku ovcu dok je najmanji $F_{ROH 4-8Mb}$

8_{Mb} (0,004) opažen kod dalmatinske pramenke. U kategoriji za duljinu ROH-a od 8-16 Mb najveću F_{ROH} vrijednost imala je dubrovačka ovca (0,018), dok je najmanju vrijednosti imala lička pramenka (0,004). $F_{ROH>16Mb}$ kretao se od 0,011 kod dalmatinske pramenke do 0,033 kod dubrovačke ovce. Prosječne, maksimalne i minimalne vrijednosti otkrivenih homozigotnih regija za svaku pasminu i kategoriju prikazane su u prilogu 11.

4.6.2. Efektivna veličina populacije hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Vrijednosti efektivne veličine populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca prikazane kao trenutna efektivna veličina procijenjena GONE softverom, te povijesna efektivna veličina populacija prikazana u trinaestoj, pedesetoj i sto pedesetoj generaciji dobivena GONE i SNeP softverom prikazane su u tablici 5. Obzirom da se vrijednosti dobivene različitim softverima značajno razlikuju i da se vrijednosti efektivne veličine populacije mijenjaju s generacijama rezultati dobiveni za efektivnu veličinu populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca prikazani su u trinaestoj, pedesetoj i sto pedesetoj generaciji kako bi bili usporedivi s ostalim autorima. Najveće efektivne veličine populacija utvrđene su kod dalmatinske pramenke ($N_e=1039$) i paške ovce ($N_e= 1005$), dok je najmanja trenutna efektivna veličina populacije od 61,79 utvrđena za krčku ovcu. Ostale hrvatske izvorne pasmine ovaca imaju niže do srednje vrijednosti efektivne veličine populacije uz iznimku ličke pramenke ($N_e= 598$) i rapske ovce ($N_e= 558$) koje pokazuju srednju do višu efektivnu veličinu populacije.

Tablica 5. Efektivna veličina populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca procijenjena GONE i SNeP softverom

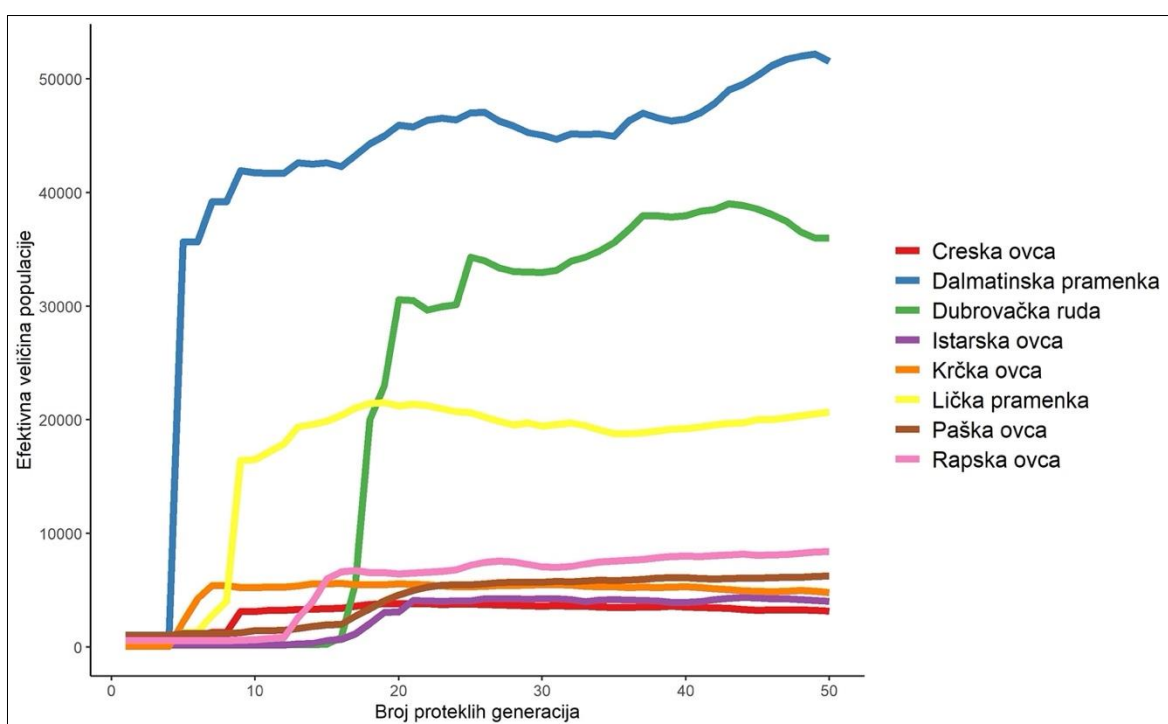
Pasmina	GONE			SNeP		
	N_e	N_{e13}	N_{e50}	N_{e13}	N_{e50}	N_{e150}
LPS	598	19361	2067	110	440	1148
CIS	148	3311	3159	96	353	850
DPS	1039	42613	51537	147	593	1534
DRS	157	206	35988	97	334	848
ISS	161	268	4030	95	317	773
KIS	61	5370	4814	82	307	776
PIS	1005	1626	6263	242	850	1938
RIS	558	2584	8398	106	401	1008

N_e – sadašnja efektivna veličina populacije; N_{e13} – procijenjena N_e prije 13 generacija; N_{e50} - procijenjena N_e prije 50 generacija; N_{e150} - procijenjena N_e prije 150 generacija

Povijesne efektivne veličine populacija dobivene SNeP i GONE softverom su vrlo različite. Procjene GONE softvera su za sve populacije veće od procjena dobivenih SNeP softverom.

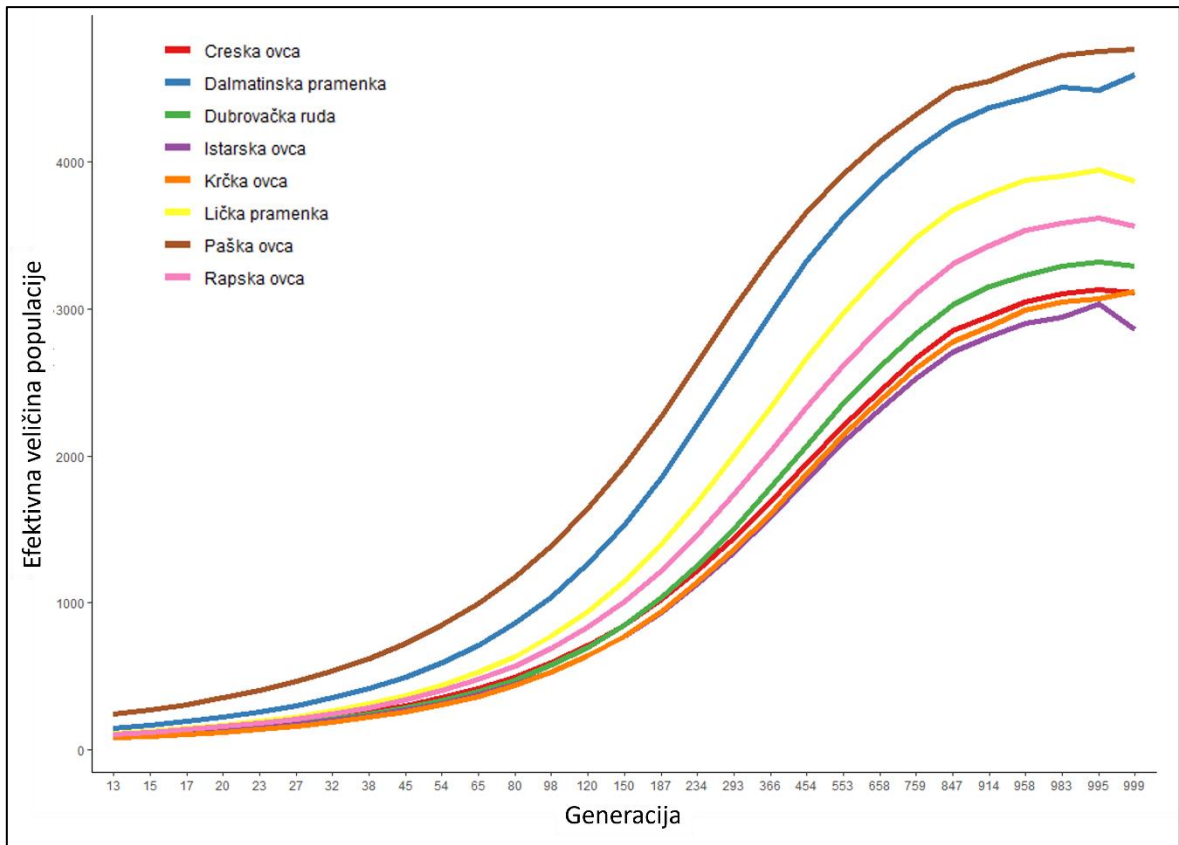
Promjene u efektivnoj veličini populacija kroz povijest dobivene GONE softverom prikazane su na grafu 7. Slično kao i kod trenutačne efektivne veličine populacija

dalmatinska pramenka i kroz povijest pokazuje najveće N_e vrijednosti. Dalmatinska pramenka pokazuje konstantno visoku efektivnu veličinu populacija od prije 50. generacije sve do 7. generacije kada je primjetan nagli pad efektivne veličine populacije sa oko 35 000 jedinki na svega 1 000 jedinki. Uz dalmatinsku pramenku, sličan trend u promjeni efektivne veličine populacije pokazuju dubrovačka ovca i lička pramenka. Njihove efektivne veličine populacija zadržavaju visoke vrijednosti tijekom povijesti te se očituje nagli pad vrijednosti oko 9. generacije kod ličke pramenke, te oko 20. generacije kod dubrovačke ovce. Rapska, paška, krčka i istarska ovca kroz povijest ne pokazuju velike promjene u trendu efektivne veličine populacije. Kod creske ovce utvrđena je najmanja povijesna efektivna veličina populacije.



Graf 7. Povijesna efektivna veličina populacije dobivena GONE softverom

Promjene povijesne efektivne veličine populacija dobivene SNeP softverom prikazane su grafom 8.



Graf 8. Povijesna efektivna veličina hrvatskih izvornih pasmina dobivena SNeP softverom

Najveću vrijednost povijesne efektivne veličine populacije u 13.-toj generaciji dobivene sa SNeP softverom pokazuje paška ovca ($N_e = 242$), a zatim dalmatinska pramenka ($N_e = 147$), lička pramenka ($N_e = 110$) i rapska ovca ($N_e = 106$). Najmanja efektivna veličina procijenjena je za krčku ovcu ($N_e = 82$). Najveća povijesna efektivna veličina populacija procijenjena je na 4 765 za pašku ovcu. Povijesna efektivna veličina populacija procijenjena za hrvatske izvorne pasmine ovaca pokazuje trend konstantnog smanjenja N_e za sve pasmine.

5. RASPRAVA

Genetska raznolikost domaćih životinja prepoznata je kao važan resurs (FAO, 2015), u kojem izvorne pasmine, prilagođene na lokalne okolišne uvjete su od posebne važnosti. One predstavljaju rezervoare genetskih resursa za održivost budućeg stočarstva u stalno mijenjajućem okolišu (Groeneveld i sur., 2010; Hoffman i sur., 2010). Za razliku od drugih domaćih životinja, ovce imaju vrlo veliku razinu genetske sličnosti što dovodi do toga da imaju izrazito nisku filogeografsku strukturu populacija (Lawson Handley i sur., 2007; Kijas i sur., 2012; Beynon i sur., 2015). Unatoč tome Kijas i sur. (2012) su dokazali da su markeri cijelog genoma dovoljni kako bi se otkrila genetska podjela na osnovi geografskog porijekla i zajedničke povijesti.

Ovim doktorskim radom, po prvi put, koristi se visoko rezolutni SNP čip (606 000 SNP) kako bi se utvrdila genetska različitost osam hrvatskih izvornih pasmina ovaca na nacionalnoj i europskoj razini. Jedan od ciljeva ovog dokorskog rada bilo je procijeniti genetsku raznolikost osam hrvatskih izvornih pasmina ovaca. Dobiveni rezultati pokazuju da je genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina ovaca usporediva s genetskom raznolikosti drugih svjetskih populacija (Kijas i sur., 2012; Ciani i sur., 2014; Beynon i sur., 2015; Edea i sur., 2017; Ciani i sur., 2020).

Korištena je analiza glavnih komponenti, procijenjeni individualni ancestralni koeficijenti, genetske udaljenosti i filogenetsko stablo kako bi se proučila populacijska struktura osam hrvatskih izvornih pasmina te kako bi ih usporedili s ostalim mediteranskim pasminama. Također, procijenjena je razina genomskog inbridinga i efektivna veličina populacija kako bi utvrdili stopu homozigotnosti genoma pojedinih pasmina te procijenili unutar populacijsku genetsku raznolikost.

5.1. Genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina ovaca

U ovom doktorskom radu otkrivena je srednje visoka genetska raznolikost hrvatskih izvornih pasmina. Najmanju genetsku raznolikost pokazala je rapska ovca kod koje je opažena heterozigotnost iznosila 0,337. Nasuprot navedenom najveću genetsku raznolikost je pokazala dalmatinska pramenka kod koje je opažena heterozigotnost iznosila 0,346. Dobiveni rezultati opažene i očekivane heterozigotnosti (tablica 3) vrlo su slični vrijednostima heterozigotnosti koje su dobili Al-Mamun i sur. (2015) za pet australskih pasmina ovaca koristeći 50k SNP čipom i Edea i sur. (2017) za etiopijske ovce koristeći 50 i 600K SNP čip. Također, slične vrijednosti očekivane heterozigotnosti utvrdili su Ciani i sur. (2014) za talijanske izvorne pasmine, Kijas i sur. (2012) za južno i zapadno europske pasmine ovaca te Deniskova i sur. (2018) za izvorne ruske pasmine ovaca.

Razina povezanosti populacija procijenjena je pomoću fiksacijskog indeksa (F_{ST} ; tablica 4). Na osnovu rezultata fiksacijskog indeksa utvrđeno je da su najudaljenije pasmine istarska ovca i dubrovačka ovca ($F_{ST} = 0,065$). Za te dvije pasmine utvrđene su najveće F_{ST} vrijednosti i u odnosu na ostale hrvatske izvorne pasmine ovaca što ukazuje da su te dvije pasmine genetski najudaljenije kako jedna od druge tako i od svih ostalih hrvatskih izvornih pasmina. Obzirom da su područjem uzgoja te dvije pasmine najizoliranije, istarska ovca se uzgaja samo na Istarskom poluotoku na sjeveru Jadranskog mora, a dubrovačka ovca na samom jugu Hrvatske, najvjerojatnije je da su one zbog prostorne izoliranosti imale najmanje doticaja s ostalim hrvatskim izvornim pasminama što objašnjava najveću genetsku udaljenost. Osim toga obje pasmine su nedavno prošle kroz proces drastičnog smanjenja broja jedinki (engl. *bottleneck*) što je vjerojatno dodatno povećalo genetsku udaljenost navedenih pasmina. Pasmine koje imaju najmanju genetsku udaljenost su lička i dalmatinska pramenka čija se uzgojna područja dodiruju. Vrlo niska F_{ST} vrijednost ($F_{ST}=0,003$) zabilježena između ove dvije pasmine sugerira vrlo visoku genetsku povezanost ove dvije pasmine. Ovako niska genetska razlika između ličke i dalmatinske pramenke najvjerojatnije je posljedica nedavnog definiranja i odvajanja dalmatinske pramenke kao zasebne pasmine, a ukazuje na to da su te dvije pasmine u prošlosti bile jedna populacija. Slične rezultate bliske povezanosti pasmina koje potječu iz istih područja primijetili su Ciani i sur. (2014).

5.2. Analiza glavnih komponenti hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Svaka od osam istraživanih hrvatskih izvornih pasmina ovaca analizom glavnih komponenti pokazala je genetsku posebnost. Jedinke iste pasmine su se grupirale zajedno na PCA grafu (graf 1). Prva komponenta (PC1) razdvojila je pasmine prema geografskoj širini odvojivši istarsku ovcu najsjevernije, zatim prateći geografske položaje otoka nastavljajući pratiti uzgojna područja ličke i dalmatinske pramenke te na kraju najjužnije smještajući dubrovačku rudu. Dobiveni rezultat preslikava geografske položaje uzgojnih područja (područja uzorkovanja) pojedinih pasmina (slika 16.). Ovakav rezultat nije u skladu s Ferenčaković i sur. (2013) koji su na temelju analiza mitohondrijske DNA i Y-kromosoma dobili lošu geografsku strukturiranost istočno-jadranskih ovaca iako su očekivali istu obzirom na razvijenost reljefa (odnos kopno – otoci). Uzrok toga može biti u odabiru markera kao i manji broj uzorkovanih jedinki za određene pasmine. Sličnu geografsku distribuciju, obzirom na područje uzgoja, dobili su Edea i sur. (2017) proučavajući strukturu populacije etiopskih ovaca s visoko rezolutnim SNP čipom (Ovine Infinium HD SNP BeadChip, 600K). Istarska ovca je pasmina koja se drugom komponentom najviše odvojila od ostalih izvornih pasmina. Odvajanje istarske ovce od ostalih hrvatskih pasmina ovaca

zabilježili su Salamon i sur. (2014) mikrosatelitnim markerima navodeći genetsku jedinstvenost istarske ovce. Fenotipski istarska ovca je hrvatska najposebnija pasmina, koja se svojom veličinom, odlikama boje i dužine runa te oblikom rogova i konveksnim nosnim profilom razlikuje od svih drugih hrvatskih izvornih pasmina. Sljedeća pasmina koju PC2 odvajaju je dubrovačka ovca. Jedna jedinka se na grafu smjestila u grupu s dalmatinskom pramenkom što može biti uzrokovano geografskom blizinom uzgojnog područja te time vjerojatnijom izmjenom genetskog materijala između te dvije pasmine. Jednako kao i istarska ovca, dubrovačka ovca se znatno fenotipski razlikuje od ostalih pramenki, a ističe se svojim finijim runom i nešto većom tjelesnom masom.

Dalmatinska i lička pramenka pokazuju veću međusobnu povezanost u odnosu na ostale izvorne pasmine što je razumljivo obzirom da su uzgojna područja tih pasmina najbliža. Lička i dalmatinska pramenka su fenotipski vrlo slične pasmine uz razliku da je lička pramenka konstitucijski nešto veća ovca.

Paška, rapska i dio krčkih jedinki tvore jednu grupu i pokazuju miješanje jedinki dok ostatak krčkih jedinki s creskom ovcom stvara drugu grupu na PCA grafu. Te dvije grupe su bliže jedna drugoj nego bilo kojoj grupi ostalih hrvatskih izvornih pasmina ovaca. Na PCA grafu vidljivo je odvajanje otočkih pasmina (paška ovca, creska ovca, rapska ovca, krčka ovca) od kopnenih pasmina (dalmatinska pramenka i lička pramenka) uz izuzetak istarske ovce i dubrovačke ovce koje se ne mogu direktno smjestiti niti u jednu grupu, iako se primjećuje da je istarska ovca bliža otočkim pasminama dok je dubrovačka ovca bliža kontinentalnim pasminama. Slične rezultate navode Salamon i sur. (2015) prostornom analizom mikrosatelitnih markera tri hrvatske izvorne pasmine gdje su se creska ovca, istarska ovca i lička pramenka jasno odvojile, te se mogu smatrati predstavnicima otočke grupe ovaca (creska ovca), kontinentalne grupe ovaca (lička pramenka) te istarska ovca kao zasebna grupa.

Rezultati dobiveni visoko rezolutnom komparativnom PCA analizom pokazuju da su hrvatske izvorne pasmine ovaca različite od ostalih europskih pasmina ovaca. Vidljivo je odvajanje otočkih pasmina (krčka ovca, creska ovca, paška ovca i rapska ovca) uz koje se sada smjestila i istarska ovca te je došla do izražaja blizina istarske ovce otočkim pasminama vidljiva na grafu 2. Dubrovačka ovca se sada približila kopnenim pramenkama (dalmatinska i lička pramenka) koje su se grupirale s ostalim pramenkama s Balkana (sjeverno-makedonska pramenka, pramenka iz Srbije, planinska karpatska ovca iz Rumunjske, valahian ovca iz Češke). Kopnene pramenke pokazale su jasno odvajanje pasmina na PCA grafu ukazujući na bolju diferenciranost između pasmina (graf 3), dok su se otočke pasmine grupirale vrlo blizu jedna druge tako sugerirajući manju diferenciranost pasmina. Takva podjela pasmina unutar jedne države vidljiva je i kod Rochus i sur. (2018) koji su zabilježili jače grupiranje pasmina južne Francuske kao što je kod nas vidljivo za

otočke pasmina ovaca, dok su pasmine sjeverne Francuske pokazale jasnije definirane populacije što se kod nas očituje kod kopnenih pramenki. Jasno je vidljivo odvajanje istok - zapad, koje se karakterizira kao odvajanje istočno europskih balkanskih ovaca pramenka tipa od zapadno-europskih pasmina ovaca, prvenstveno francuskih pasmina i španjolske churra pasmine. Odvajanje pasmina temeljeno na odnosu istok-zapad uočili su Ciani i sur. (2020) na većem setu podataka u kojem su obuhvatili i pasmine s područja Bliskog istoka i sjevera Europe. Tada se odvajanje istok -zapad temeljilo na podjeli između iranskih masno repih ovaca i sjeverno europskih tankorepih ovaca. Na grafu 3 primjećuje se centralna pozicija talijanskih pasmina altamura i leccese te corse ovce s otoka Korzike koje su poveznica istočnoeuropskih pasmina s zapadnom Europom. Uzimajući u obzir da je većina hrvatskih izvornih pasmina ovaca tijekom povijesti oplemenjivanja s talijanskim merino ovnovima takav odnos nije iznenađujući. Isti rezultati su potvrđeni i u Ciani i sur. (2020), a oni sugeriraju da je protok gena išao iz balkanske regije preko Italije pa sve do Španjolske, centralne i sjeverne Europe. Također, dodaju da genetska sličnost balkanskih pramenki s južno talijanskim i španjolskim pasminama potvrđuje neolitičku mediteransku migracijsku rutu, što sugerira da su ovce tijekom neolitizacije s čovjekom stigle iz područja plodnog polumjeseca preko Mediterana na talijanski poluotok i onda dalje u centralnu i sjevernu Europu (Gkiasta i sur., 2003). Kao što je prethodno pronađeno kod goveda i koza (Colli i sur., 2018; Decker i sur., 2014) filogenetske analize pokazuju da regionalno porijeklo ima najveći utjecaj kod određivanja genetske raznolikosti, a očituje se na način da se pasmine koje imaju geografski najbliža uzgojna područja grupiraju zajedno. Sukladno tome su se grupirale i hrvatske izvorne pasmine ovaca.

5.3. Analiza strukture populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Analiza strukture izvornih hrvatskih pasmina ovaca pokazala je da dubrovačka ovca i istarska ovca imaju specifičnu strukturu s vrlo niskim razinama pasminskih umješavanja. Tek jedna jedinka istarske ovce i 10 jedinki dubrovačke ovce pokazuju nešto veću razinu genetskog miješanja s udjelima kopnene komponente od 50% što upućuje na nedavno ili kontinuirano izmjenjivanje genetskog materijala s tim pasminama. Specifičnu strukturu istarska ovca je pokazala i u istraživanjima Ciani i sur. (2014) kada se vrlo niskom $K=8$ izdvaja kao zasebna pasmina, dok se većina talijanskih pasmina grupira u nekoliko klastera. Tri otočke pasmine, creska ovca, paška ovca i rapska ovca pokazuju zajednički ancestralni genom. Paška i rapska ovca imaju i jednake udjele kontinentalnog genoma koji čini 50% populacijske strukture tih pasmina. Krčka ovca pokazuje specifičnu strukturu gdje se populacija dijeli na tri subpopulacije. Dvije subpopulacije pokazuju dominaciju pojedinog ancestralnog genoma dok jedna populacija zadržava genetsku strukturu sličnu ostalim

otočkim pasminama. Uzrok takvog odvajanja unutar populacije krčke ovce može biti posljedica smanjenog izmjenjivanja genetskog materijala unutar populacija krčke ovce kada pod djelovanjem inbridinga i genetskog drifta dolazi do fiksacije gena i mijenjanja strukture populacije. Lička i dalmatinska pramenka pokazuju identičnu ancestralnu strukturu što sugerira da su te dvije pasmine genetski jedna populacija ovaca. Ovakav rezultat potvrđen je i F_{ST} analizom.

Prikazom ancestralnih udjela genoma podjela na otočke i kopnene pasmine dolazi još više do izražaja uz iznimku istarske ovce i dubrovačke ovce koje zadržavaju jedinstvene ancestralne genome.

Prilikom stavljanja izvornih hrvatskih pasmina ovaca u europski kontekst do izražaja dolazi velika genetska raznolikost hrvatskih populacija ovaca. Najprije kod $K=2$, dva fenotipski različita klastera se odvajaju, pramenke i rude od zapadno europskih pasmina ovaca. Slična podjela je vidljiva i u rezultatima Petera i sur. (2007) koji je na mikrosatelitnim markerima proučavao genetsku raznolikost 57 europskih i bliskoistočnih pasmina ovaca. Hrvatske pasmine ovaca zadržavaju istu genetsku podjelu kao i kod prikaza rezultata structure analize samo za hrvatski set podataka gdje dubrovačka ovca i istarska ovca imaju diferenciranu strukturu s vrlo malim udjelom umješavanja, dok ostale hrvatske izvorne pasmine, dijeleći se na otočke i kontinentalne pasmine, pokazuju nepotpunu pasminsku diferencijaciju. Analiza je pokazala da nekoliko pasmina ima visoke udjele ancestralnih genoma koji pripadaju više klastera.

Kontinentalne pasmine dalmatinska i lička pramenka po strukturi su identične s ostalim kontinentalnim pramenkama koje se nalaze u setu podataka, pramenki iz Sjeverne Makedonije, sumavskoj ovci i planinskoj karpatskoj ovci. One pokazuju vrlo visoku pasminsku izmiješanost, a najveće ancestralne udjele kod $K=11$ imaju pramenka iz Srbije, churra ovca, valachian ovca i dubrovačka ovca. Vrlo slične rezultate dobila je Ciani i sur. (2020) FineStructure analizom istočnih i jugoistočnih europskih pasmina ovaca na 50K SNP čipu koja pokazuje nepotpunu diferencijaciju ovaca u pramenka tipu i miješanje dalmatinske pramenke s lrom, lipskom i ovchepolan ovcom. Ovakav rezultat je pokazatelj da se definirane pasmine ne podudaraju s stvarnim populacijskim granicama te sugerira izmjenu genetskog materijala između tih populacija. Obzirom da smo unazad 25 godina bili ista država izmjena genetskog materijala između kontinentalnih pramenki je bila vrlo vjerojatna, a obzirom da se ne provodi intenzivna selekcija kod dalmatinske i ličke pramenke, pet generacija nije dovoljno kako bi došlo do genetskog diferenciranja tih pasmina. Daljnjim povećanjem pretpostavljenih populacija postotak pripadnosti određenoj populaciji se smanjuje ispod 20% što objašnjava da su klasteri samo djelomično hijerarhijski (Rosenberg i sur., 2002). Pod pretpostavkom da je $K=11$, jedanaest pasmina je pokazalo jedinstvenu pasminsku strukturu dok su se ostale pasmine podijelile u pet grupa, slika 22.

Analiza glavnih komponenti i analiza strukture populacija jasno su pokazale da među hrvatskim izvornim pasminama ovaca postoji određeni stupanj izmiješanosti populacija koji je najmanji kod istarske ovce i dubrovačke ovce.

5.4. Analiza genetskih udaljenosti hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Odnos između pojedinih hrvatskih izvornih pasmina ovaca i muflona određen je pomoću Nei genetskih udaljenosti (Nei, 1972) koje imaju korekciju na genetski drift i mutacije. Veće vrijednosti genetske udaljenosti predstavljaju i vremenski duže odvojene populacije. Najdužu granu imao je muflon što potvrđuje očekivanja obzirom da je muflon divlji izvorni oblik ovaca, slika 23. Dužina grane koja pripada muflonu potvrđuje da je genetska udaljenost muflona veća od bilo koje udaljenosti između ovaca, te da se odvajanje muflona i ovaca dogodilo puno prije nego odvajanje pasmina unutar vrste *Ovis aries*. Prikazom genetskih udaljenosti Neighbour Net grafom potvrđuju se rezultati dobiveni analizom glavnih komponenti i analizom strukture populacija. Jasno je vidljivo odvajanje otočkih pasmina kojima se na istom dijelu mreže pridružuje istarska ovca, te kopnenih pasmina zajedno s dubrovačkom ovcom. Od svih hrvatskih izvornih pasmina ovaca dubrovačka ovca i istarska ovca imaju najduže grane što sugerira njihovu manju povezanost s ostalim pasminama, a potvrda je rezultata povezanosti populacija dobivenog pomoću F_{ST} vrijednosti. Također, potvrđuje se i najveća povezanost ličke i dalmatinske pramenke obzirom da grane te dvije pasmine izlaze iz istoga dijela mreže, a duljina grane je mala sugerirajući nedavno odvajanje tih pasmina.

Slično grupiranje pasmina pojavljuje se i kod Ciani i sur. (2014) gdje se određene pasmine grupiraju na način da se pasmine iz istih regija sa sličnim morfološkim osobinama nalaze bliže na grafu.

Kako bi bolje razumjeli genetske odnose između hrvatskih izvornih pasmina ovaca uzimajući u obzir povezanost s drugim pasminama ponovno su izračunate Nei genetske udaljenosti nakon dodavanja europskih pasmina, slika 24. Neighbour Net analiza s europskim populacijama ovaca potvrđuje odvajanje pramenki od ostatka europske populacije ovaca. Do izražaja dolazi posebnost hrvatskih izvornih pasmina s otoka koje se odvajaju u jednu granu i ne grupiraju s ostalim europskim pasminama tako potvrđujući specifičnost svog genoma. Ciani i sur. (2020) analizom na 50K SNP čipu pokazuju slično odvajanje hrvatskih otočkih izvornih pasmina ovaca od ostalih europskih pasmina, te njihovo pozicioniranje između pramenki i talijanskih ovaca. Za razliku od prethodnog grafa ovdje se dubrovačka ovca više odvoja od ostalih hrvatskih izvornih pasmina s kopna. Lička i dalmatinska pramenka potpuno su se odvojile u grupu sa srpskom pramenkom i ukrajinskom planinskom karpatskom ovcom iako srpska pramenka dužinom grane

pokazuje nešto veću genetsku udaljenost. Time su opet potvrđeni odnosi dobiveni u Ciani i sur. (2020) koji su pokazali grupiranje ličke i dalmatinske pramenke s ostalim balkanskim pramenkama. Odvajanje hrvatskih otočkih i kopnenih pasmina sugerira da geografske barijere imaju utjecaj na oblikovanje današnje strukture hrvatskih izvornih pasmina. Veća geografska udaljenost s preprekama poput mora i planina smanjila je izmjenu genetskog materijala između ove dvije grupe pasmina i time uzrokovala jasnije odvajanje tih pasmina. Ovdje se ne smiju zanemariti niti prošli protoci gena i umješavanja populacija koja su bila vrlo vjerojatna između balkanskih populacija ovaca, a koja su i danas vidljiva u genetskoj strukturi hrvatskih izvornih pasmina ovaca s kopna. U bivšoj državi na području teritorija današnje Republike Hrvatske uzgajala se takozvana balkanska pramenka koja je ovisno o mjestu uzgoja razvijala različite tipove (sojeve), pa su tako bili poznati dubski soj, privorski soj, zetski soj i druge ovce (Mitić, 1987). Kasnije raspadom Jugoslavije smanjuje se protok gena između tipova i formiraju se pasmine koje još uvijek pokazuju veliku genetsku povezanost. Osim toga češće i u većem obujmu umješavanje talijanskih merino pasmina u otočke populacije, posebice pašku ovcu kroz povijest je približio te pasmine talijanskim pasminama što se očituje i na prikazu genetskih udaljenosti na slici 4, bez obzira što nema predstavnika merino ovaca koji su sudjelovali u oplemenjivanju hrvatskih izvornih pasmina ovaca.

Prikljanje muflona francuskoj corse ovcu objašnjeno je saznanjem da su mufloni introducirani u Europu prilikom vala neolitizacije prije 6 000 – 7 000 godina i to prvenstveno na područje Korzike i Sardinije (Vigne i sur., 2009). Od 18. stoljeća mufloni s Korzike i Sardinije naseljavaju su kao divljač po Europi, prvenstveno sjeveru Italije i Austriji (Guerrini i sur., 2015), a od 1990. godine i na područje Hrvatske (Krapinec, 2001). Divlje populacije muflona na Sardiniji i Korzici imaju kontakt s lokalnim ovcama (Barbato i sur., 2017) i pokazuju određenu razinu miješanja te dvije vrste (Meadows i sur., 2011) što se također objašnjava smještanjem muflona na istu granu s corse ovcu.

5.5. Filogenetska analiza hrvatskih izvornih pasmina ovaca

TreeMix program koristi frekvencije alela kako bi odredio odnose između populacija modeliranjem filogenetskih stabala uz indiciranje protoka gena između populacija. Kako bi se utvrdili filogenetski odnosi između populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca, konstruirano je stablo maksimalnih vjerojatnosti Treemix programom, slika 25. Prikaz povijesti populacija procjenom maksimalne vjerojatnosti bez pretpostavljenih migracija potvrđuje odnose koji su otkriveni Neighbour net analizom. Posebno je vidljivo odvajanje hrvatskih izvornih pasmina ovaca prema geografskoj strukturiranosti na populacije otočkih i kopnenih pasmina. Pregledani su ostaci stabla, slika 26., kako bi se procijenilo koliko je

dobro model predstavio odnose u populacijama. Ostaci koji su veći ili manji od nule pokazuju da su te populacije više ili manje bliže jedna drugoj nego što su predstavljene na grafu. Prema navedenom, implicira se da je genetska povezanost muflona s dubrovačkom ovcom i paškom ovcom, te povezanost creske i krčke ovce veća nego što to evolucijsko stablo pokazuje kada nisu dozvoljene migracije. Model koji najbolje opisuje odnose između hrvatskih izvornih pasmina ovaca procijenjen je na jednu migraciju. Model s jednom migracijom (slika 27.) sugerira vrlo vjerojatnu migraciju iz muflona u pašku ovcu čime se i dokazuje manja genetska udaljenost između te dvije populacije nego što je to predstavljeno stablom maksimalne vjerojatnosti. Stablo zadržava istu filogenetsku podjelu pasmina, no objašnjava ostatke vezane uz stablo maksimalnih vjerojatnosti bez migracija. Na stablu s četiri migracije, (prilog 10) vidljiv je protok gena muflona u rapsku ovcu i dubrovačku ovcu. Obzirom da je populacija muflona uzorkovana na otoku Rabu, a poznato je da može doći do izmjene gena između te dvije vrste (Barbato i sur., 2015), ova migracija je vrlo vjerojatna. Migracija gena dalmatinske pramenke u pašku ovcu ima vrlo visoku migracijsku težinu. Dalmatinska pramenka i paška ovca se dodiruju svojim uzgojnim područjem što može biti jedno od objašnjenja prikazane migracije, no također iz povijesti nastanka paške ovce poznato je da je paška ovca nastala od lokalne pramenke križanjem s merino ovcama (Mitić, 1987). Migracija ličke pramenke u istarsku ovcu ima vrlo nisku težinu, ali predstavlja potencijalnu izmjenu genetskog materijala tijekom povijesti kada su u Istru bile dovezene manje slabije produktivne ovce sa srednjeg dijela balkanskog poluotoka (Agencija za ruralni razvoj Istre). Pasmine koje su prošle kroz veći ili manji stupanj smanjenja veličine populacija (engl. *bottleneck -genetsko usko grlo*), istarska ovca i dubrovačka ovca, imaju najduže grane na stablu maksimalnih vjerojatnosti.

Stablo maksimalnih vjerojatnosti na slici 28 prikazuje detaljniji pogled genetskih odnosa između hrvatskih i europskih pasmina. Stablo se u potpunosti slaže s rezultatima dobivenim analizom glavnih komponenti te mrežom genetskih udaljenosti. Hrvatske izvorne pasmine ovaca odvajaju se u grupu otočkih ovaca kojima se pridružuje istarska ovca pokazujući najveću genetsku udaljenost obzirom na dužinu grane. Lička i dalmatinska pramenka zajedno s dubrovačkom ovcom grupiraju se s ostalim balkanskim pramenkama. Dok se lička i dalmatinska pramenka uže grupiraju s češkim, ukrajinskim i srpskim pramenkama, dubrovačka ovca na stablu maksimalnih vjerojatnosti pokazuje bližu genetsku povezanost sa sjeverno makedonskom pramenkom. Valachian ovca i srpska pramenka i ovdje pokazuju veću genetsku udaljenost od ostalih pramenki. Pasmine zapadnoeuropskih ovaca korištene u ovom setu podataka pokazuju slične filogenetske odnose onima dobivenim u Rochus i sur. (2018), a očituju se odvajanjem francuskih od talijanskih pasmina te smještanjem corse ovce u istu grupu s talijanskim altamura i leccese ovcama. Populacijsko stablo koje najbolje objašnjava genetske odnose pasmina

prezentiranim u europskom setu podataka ima sedam migracija, slika 29. Migracija s najvećom vjerojatnošću je migracija pramenki u korijen talijanskih pasmina. Migraciju gena iz balkanskih pramenki u sjeverno talijanske pasmine predložili su Ciani i sur. (2020) na temelju rezultata dobivenih prostornom analizom glavnih komponenata. Obzirom da dvije pasmine nisu u merino tipu ovaca, te da ne postoje zapisi koji potvrđuju upliv gena tih pasmina u populacije hrvatskih izvornih pasmina ovaca ovakva migracija može se objasniti povijesnom izmjenom gena koja bi bila potvrda mediteranskog puta širenja ovaca tijekom neolitizacije. Jedan od pretpostavljenih puteva širenja ovaca u Italiju i Europu ide iz domestikacijskog centra jadranskom obalom do sjevera Italije odakle se dalje širi prema jugu Italije, Francuske i Španjolske. Altamura i leccese ovca su dvije talijanske pasmine koje također pripadaju pramenka tipu ovaca, a altamura ima azijsko porijeklo, pretpostavlja se sirijsko. Vrlo zanimljiva je migracija merina d'arles u sjeverno makedonsku ovcu i migracija iz korijena merino ovaca u dubrovačku rudu. Ova migracija potvrđuje povijest nastanka dubrovačke ovce koja i svojim fenotipskim karakteristikama, otvorenijim i finijim runom, pokazuje veći udio merino ovaca u genotipu od ostalih hrvatskih izvornih pasmina ovaca. Manju ancestralnu proporciju merino genotipa u dubrovačkoj rudi također su pronašli Ciani i sur. (2020) analizom umiješanosti populacija. Migracija sa slabijom težinom je migracija muflona u corse ovcu. Ta migracija je potvrđena analizom genetskih udaljenosti predstavljenih Neighbour Net mrežom i objašnjena porijeklom muflona koji obitava na hrvatskom teritoriju. Ostale migracije francuskih pasmina posljedica su nastanka pojedinih pasmina ili križanja populacija, a objašnjene su u radu Rochus i sur. (2018). Migracija između čeških ovaca valachian i sumavske pod pretpostavkom je zajedničkog porijekla ove dvije pasmine.

5.6. Genomski inbriding hrvatskih izvornih pasmina ovaca

ROH-ovi su kontinuirani homozigotni segmenti koji su česti kod jedinki i populacija. Pružaju korisne informacije o genetskoj srodnosti između jedinki čime se otkrivaju moguće štetne varijante u genomu te daju informacije o demografskoj evoluciji populacije tijekom vremena. ROH se koristi kao indikator razine inbridinga u populacijama. Izračunavanje koeficijenta inbridinga iz ROH (F_{ROH}) točnije je za procjenu autozigotnosti i za otkrivanje prošlih i novijih učinaka inbridinga od procjene inbridinga na temelju podataka u rodovniku (Ferenčaković i sur., 2013; Kim i sur., 2015).

U populacijama hrvatskih izvornih pasmina zabilježen je niski i pozitivni inbriding (0,025-0,070) što sugerira da životinje u analizi nisu visoko povezane. Slični koeficijenti inbridinga pronađeni su kod talijanske pasmine valle del belice u radu Mastrangela i sur. (2017).

Kod svih jedinki hrvatskih izvornih pasmina pronađeni su ROH-ovi veći od 1Mb. Vrijednost F_{ROH} za duljinu homozigotne regije veću od 2 Mb kretala se od 0,028 za dalmatinsku pramenku do 0,075 za dubrovačku rudu. Slični rasponi F_{ROH} vrijednosti dobiveni su za ruske pasmine ovaca (Deniskova i sur., 2018) i većinu talijanskih pasmina ovaca (Mastrangelo i sur., 2018), dok su veće razine inbridinga pronađene kod barbaresca, delle langhe, leccese i valle dell belice pasmina ovaca (Mastrangelo i sur., 2018) te afričke pasmine ovaca (Dzomba i sur., 2021). Dubrovačka ovca proživjela je drastično smanjenje broja jedinki tijekom 90-tih godina proteklog stoljeća. Revitalizacija pasmine koja je počela 2003. godine je obuhvatila 112 jedinki (Mioč i sur., 2003) koje su genetska osnova današnje populacije dubrovačke ovce, a tako mali broj genotipova doveo je do povećane razine inbridinga kod dubrovačke ovce. Homozigotne regije veće od 2 Mb pronađene su za sve jedinke creske i rapske ovce dok ostale pasmine imaju barem jednu jedinku kod koje nisu pronađene homozigotne regije te duljine. Povećanjem duljine homozigotne regije smanjivao se broj jedinki kod kojih je ROH te kategorije prisutan. Kod najveće kategorije homozigotne regije duljine 16 Mb sve hrvatske izvorne pasmine su imale jedinke kod kojih nisu pronađeni ROH-ovi. Pasmına s najmanjom proporcijom jedinki u ROH kategoriji >16 Mb bila je dalmatinska pramenka kod koje su tek u 32% jedinki bile prisutne homozigotne regije dulje od 16 Mb. Distribucija dužina ROH-ova s dominacijom kratkih homozigotnih segmenata u skladu je s rezultatima dobivenim u raznim populacijama ovaca (Al-Mamun i sur., 2015; Mastrangelo i sur., 2018; Mastrangelo i sur., 2017; Purfield i sur., 2017; Deniskova i sur., 2018, Nosrati i sur., 2021). Obzirom da tijekom mejoze dolazi do rekombinacija koje prekidaju duge kromosomske segmente, dugačke homozigotne regije smatraju se rezultatom inbridinga koji se dogodio nedavno ($ROH > 10$ Mb ~ 5 generacija), dok su kratki ROH segmenti rezultat IBD regija koje potječu od dalekog zajedničkog pretka i sugeriraju inbriding koji se dogodio i prije 50 generacija ($ROH > 1$ Mb), (Kirin i sur., 2010, Ferencaković i sur., 2013; Čurik i sur., 2014). Rezultati pokazuju povećanje broja homozigotnih regija od 20. generacije pa sve do treće generacije unazad. Sukladno tome dolazi i do povećanja inbridinga koeficijenta s 0,005 unazad 25 generacija na 0,021 unazad tri generacije uprosječno za sve pasmine. Povećanje vrijednosti koeficijenta inbridinga sugerira nedavno opadanje u efektivnoj veličini populacija, no isto tako prikazuje prisustvo homozigotnih regija kako danas tako i u prošlosti pasmina.

Uzrok povećanja nedavnog inbridinga može biti dugotrajnije korištenje istih ovnova u stadima i veće parenje jedinki u srodstvu kako je predloženo u radu Mastrangela i sur. (2017) kao objašnjenje za nedavno povećani inbriding kod valle del belice ovce. Jednako kao i na Siciliji i u Hrvatskoj stočari primjenjuju prirodni pripust, a ovnovi se u stadima koriste kroz nekoliko godina ili se jedan ovan koristi u više stada što rezultira povećanjem inbridinga i posljedično tome smanjenjem varijabilnosti. Akumuliranje dugačkih homozigotnih regija u

jedinkama može imati posljedice na smanjenje fitnesa. Isto tako, duge homozigotne regije obogaćene su genomskim regijama koje nose štetne mutacije pa je tako dokazano da su genomске regije koje sadrže dugačke ROH-ove povezane sa smanjenom količinom mlijeka kod holstein goveda (Pryce i sur., 2014), smanjenom plodnošću kod bikova (Ferenčaković i sur., 2017) i krava (Kim i sur., 2015; Martikainen i sur., 2017) koja je najvjerojatnije uzrokovana inbriding depresijom.

Kratke homozigotne regije prikazuju selekciju kroz duži vremenski period. Rekombinacije su u ovom slučaju imale više vremena da pocijepaju homozigotne regije koje su bile uzrokovane selekcijom na određena svojstva (Purfield i sur., 2017).

5.7. Efektivna veličina populacija hrvatskih izvornih pasmina ovaca

Efektivna veličina populacije koristi se za praćenje genetske raznolikosti i pomaže objasniti evoluciju populacija. Također, efektivna veličina populacija je glavni indikator pojave rizika od genetske erozije (Tenesa i sur., 2007). Već dugi niz godina poznato je da praćenje efektivne veličine populacija je važan alat za dugoročnu konzervaciju ugroženih populacija (Notter, 1999; Gandini i sur., 2004; Biscarini i sur., 2015).

Danas postoji puno različitih softvera koji procjenjuju efektivnu veličinu populacija, a najzastupljeniji softver za procjenu efektivne veličine populacije kod domaćih životinja je SNeP softver (Barbato i sur., 2015) koji procjenjuje N_e iz molekularnih podataka na temelju povezanosti s LD-om. Program procjenjuje efektivnu veličinu populacija od unazad 13 generacija jer za recentnije procjene se nije pokazao pouzdanim. Procjena povijesne efektivne veličine populacija za hrvatske izvorne pasmine ovaca pokazuje jasan trend smanjenja efektivne veličine populacije koji je vidljiv i kod ostalih europskih i svjetskih pasmina ovaca (Kijas i sur., 2012; Ciani i sur. 2014; Deniskova i sur., 2018). Najveći pad efektivne veličine populacije zabilježen je zadnjih 100-200 godina kod svih pasmina ovaca. Od hrvatski izvornih pasmina paška ovca je pokazala najveću efektivnu veličinu populacija preko svih generacija. Najveću vrijednost N_{e13} imale su paška ovca (242) i dalmatinska pramenka (147), dok je najmanja efektivna veličina populacije zabilježena kod krčke ovce (82). Hrvatske izvorne pasmine ovaca pokazale su veću efektivnu veličinu populacije u 13. generaciji nego što je to procijenjeno za iranske pasmine ovaca na 600K SNP čipu te također i veću efektivnu veličinu skoro svih populacija u 150. generaciji (Khabisi i sur., 2021). Isti trend N_e hrvatskih izvornih pasmina ovaca nastavlja se i u 50. generaciji kada su opet najveće N_e procijenjene za pašku ovcu (850) i dalmatinsku pramenku (593), a najmanja N_e procijenjena za krčku ovcu (307). Sve hrvatske izvorne pasmine ovaca pokazale su veću efektivnu veličinu populacija od talijanske altamura ovce. Creska ovca, krčka ovca, istarska ovca i dubrovačka ovca imale su N_{e50} u rasponu od 307-353 što je slično

procijenjenoj efektivnoj veličini u 50. generaciji za talijansku sardinijsku povijesnu crnu ovcu, delle langhe ovcu (Ciani i sur. 2014), chios ovci, švicarskoj crno-smeđoj planinskoj ovci (Kijas i sur., 2012). Procijenjena efektivna veličina populacija za pašku ovcu u 50. generaciji je bila vrlo slična australskom merinu (Kijas i sur., 2012) i castellana ovci (Barbato i sur., 2015).

Opaženo opadanje efektivne veličine populacija tijekom vremena uzrokovana je specijalizacijom ovaca na proizvodne osobine (mlijeko-vuna) koje je počelo prije 4 000-5 000 godina (Chessa i sur., 2009), dok je opadanje efektivne veličine populacije u posljednjih nekoliko stotina godina povezano je sa selekcijom ovaca i podjelom na subpopulacije (Kijas i sur., 2012).

Procjena sadašnje efektivne veličine populacije u ovom doktorskom radu napravljena je s GONE programom. GONE program je u simulacijama pokazao vrlo preciznu procjenu efektivne veličine populacije do unazad 200 generacija. Za razliku od ostalih programa GONE vrlo točno prikazuje promjene N_e tijekom povijesti čak i ako se radi o značajnim povećanjima ili smanjivanjima vrijednosti (Santiago i sur., 2020; Wang i sur., 2016).

Promjene u povijesnoj efektivnoj veličini populacija dalmatinske pramenke, ličke pramenke i dubrovačke ovce bile su očitije s većim razlikama N_e vrijednostima. Efektivna veličina populacije dalmatinske pramenke pokazuje trend laganog smanjenja efektivne veličine populacije od 50. generacije sve do 5. generacije kada počinje naglo opadati i doseže vrijednost od 35 668. Dodatni nagli pad efektivne veličine populacije očituje se u sljedećoj generaciji, što se dogodilo otprilike prije 12 godina kada N_e opada na 1 039,27 te tu vrijednost zadržava i danas. Dubrovačka ovca i lička pramenka ne dosežu visinu efektivne veličine populacije dalmatinske pramenke. Dubrovačka ovca, promatrano unazad 50 generacija, doseže maksimalnu vrijednost od 39 013 prije 43 generacije i lagano počinje opadati sve do 19. generacije. Nakon toga efektivna veličina populacije dubrovačke ovce naglo opada na 256 u samo pet generacija (otprilike 18 godina) i slične vrijednosti zadržava do danas. Lička pramenka pokazuje slične trendove kao dubrovačka ovca uz nešto niže vrijednosti efektivne veličine populacije koje se kreću oko 20 000. Slične vrijednosti zadržava sve do prije 9 generacija kada naglo opada i današnju vrijednost ($N_e=598$) doseže prije četiri generacije (otprilike prije 12 godina). Ove tri pasmine pokazuju visoku povijesnu efektivnu veličinu populacije koje se pojavljuje još kod ruskih pasmina gissar i aykol (Deniskova i sur., 2019).

Ostale hrvatske izvorne pasmine ovaca imaju gotovo linearni trend efektivne veličine populacija, uz maksimalnu vrijednost od 8 398 za rapsku ovcu (prije 50 generacija), 6 263 za pašku ovcu (prije 50 generacija), 5 563 za krčku ovcu (prije 20 generacija), 4 368 za istarsku ovcu (prije 44 generacija) te 3 826 za cresku ovcu (prije 22 generacije). Procjene

efektivne veličine populacije hrvatskih izvornih pasmina ovaca slične su onima procijenjenima za svjetske pasmine ovaca (Purfield i sur., 2017, Deniskova i sur., 2018. Kijas i sur., 2012, Beynon i sur., 2015). Vrlo niska efektivna veličina populacije dubrovačke ovce slična je onoj opaženoj kod ruske kuchugur pasmine ($N_e=65$), švedske gute ovce ($N_e=68$), a najvjerojatnije je posljedica domovinskog rata kada je poznato da je broj ovaca dubrovačke ovce pao na svega nekoliko jedinki. Vrlo visoke vrijednosti povijesne efektivne veličine populacije za određene pasmine pokazuju da su te pasmine kroz povijest bile vrlo rasprostranjene na području Republike Hrvatske te potvrđuju povijesne zapise o uzgoju velikog broja ovaca (1 105 078 ovaca) na području današnje Dalmacije (Defilipis, 1966). Također, vrlo visoki linearni trend efektivne veličine populacije paške ovce može se pripisati sustavnom djelovanju stočara još od 1870. godine kada je osnovano društvo za unapređenje ovčarstva „Gregge Modella“ (Pavlinić i sur., 1936).

Visoka efektivna veličina populacija, slična onima dobivenim za komercijalne pasmine kao što su texel i romanov (Rochus i sur., 2020), može biti uzrokovana križanjima izvornih pasmina ovaca s drugim ovnovima u svrhu oplemenjivanja, ponajprije merino ovnovima, ali isto tako i refleksija njihovog trenutno brojnog stanja posebice kod dalmatinske pramenke.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja strukture populacije hrvatskih izvornih pasmina ovaca i procjene njihovog genetskog statusa može se zaključiti sljedeće:

1. Hrvatske izvorne pasmina ovaca uspješno su genotipizirane visokorezolutnim SNP čipom (Infinium Ovine HD, 606 000 SNP).
2. Hrvatske izvorne pasmina pokazuju visoku genetsku raznolikost unutar populacija koja se očituje visokom razinom heterozigotnosti.
3. Utvrđena je podjela hrvatskih izvornih pasmina uzrokovana geografskim barijerama na otočke i kontinentalne pasmine. Grupu otočkih pasmine čine istarska, creska, paška, rapska i krčka ovca, dok su se u grupu kontinentalnih pasmina smjestile dalmatinska pramenka, lička pramenka i dubrovačka ovca.
4. Kod istarske ovce i dubrovačke ovce utvrđena je velika pasminska diferenciranost koja ih je jasno odvojila od ostalih istraživanih pasmina.
5. Paška ovca i rapska ovca se nisu u potpunosti diferencirale, kao ni lička i dalmatinska pramenka što sugerira zajedničko porijeklo tih pasmina.
6. U širem kontekstu s mediteranskim pasminama ovaca hrvatske izvorne pasmine zauzimaju središnju poziciju između istočnoeuropskih pasmina i zapadnoeuropskih pasmina time sugerirajući da je protok gena iz centra domestikacije u srednju i sjevernu Europu išao mediteranskim putem i preko istočne obale Jadranskog mora.
7. Hrvatske izvorne pasmine čine zasebnu grupu ovaca pramenka tipa zajedno s ostalim istočnoeuropskim ovicama (makedonska pramenka, srpska pramenka, valachian ovca, karpatska planinska ovca).
8. Kod dalmatinske pramenke, ličke pramenke, paške ovce i rapske utvrđene su niske razine inbridinga i visoke efektivne veličine populacije što ukazuje na genetsku stabilnost tih pasmina.
9. Kod ostalih hrvatskih izvornih pasmina utvrđene su više razine inbridinga i manje efektivne veličine populacije ($N_e < 100$) što upozorava da se za te pasmine treba pažljivo provoditi uzgojno selekcijski rad.
10. Posebnost hrvatskih izvornih pasmina utvrđena je na osam genomskih regija.

Istraživanje ovog doktorskog rada financirano je od strane HRZZ projekta IP-2018-01-8708, „Primjena NGS metoda u procjeni genomske varijabilnosti preživača – ANAGRAMS“.

7. LITERATURA

- Abdul-Muner P. M. (2014). Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International* 1-11, doi: 10.1155/2014/691759
- Agencija za ruralni razvoj Istre. Zaštita istarske ovce. Preuzeto s: www.azrri.hr/index.php?id=62
- Al-Mamun H. A., Clark S. A., Kwan P., Gondro C. (2015). Genome-wide linkage disequilibrium and genetic diversity in five populations of Australian domestic sheep. *Genet. Sel. Evol.* 47: 90. doi: 10.1186/s12711-015-0169-6
- Ballou J. (1983). Calculating inbreeding coefficients from pedigrees. U: *Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations* (ur., Schonewald-Cox C. M., Chambers S. M., MacBryde B., Thomas L.). Benjamin/Cummings Publishing Company. Menlo Park, California, USA. str 509-520
- Barać Z., Bedrica Lj., Čačić M., Dražić M., Dadić M., Ernoić M., Fury M., Horvath Š., Ivanković A., Janječić Z., Jeremić J., Kezić N., Marković D., Mioč B., Ozimec R., Petanjek D., Poljak F., Prpić Z., Sindičić M. (2011). Zelena knjiga izvornih pasmina Hrvatske. Ministarstvo zaštite okoliša i prirode, Državni zavod za zaštitu prirode, Hrvatska poljoprivredna agencija, Nacionalni park Krka, COAST, Zagreb
- Barać Z., Mioč B., Čokljat Z. (2006). Ovčarstvo u Primorsko-goranskoj županiji. Hrvatski savez zadruga, Zagreb, Hrvatska
- Barać Z., Mioč B., Havranek J., Samarzija D. (2008). Paška ovca hrvatska izvorna pasmina. Grad Novalja, Matica hrvatska, Novalja, Hrvatska
- Barbato M., Hailer F., Orozco-terWengel P., Kijas J., Mereu P., Cabras P., Mazza R., Pirastru M., Bruford M. W. (2017). Genomic signatures of adaptive introgression from European mouflon into domestic sheep. *Sci Rep* 7: 7623. doi: 10.1038/s41598-017-07382-7
- Barbato M., Orozco-ter Wengel P., Tapio M., Bruford M. W. (2015). SNeP: a tool to estimate trends in recent effective population size trajectories using genome-wide SNP data. *Front Genet.* 6: 109. doi: 10.3389/fgene.2015.00109
- Baumung R., Cubric-Curik V., Schwend K., Achmann R., Sölkner J. (2006). Genetic characterisation and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *J Anim Breed Genet.* 123 (4): 265-271. doi: 10.1111/j.1439-0388.2006.00583.x

- Beynon S. E., Slavov G. T., Farre M., Sunduimijid B., Waddams K., Davies B., Haresign W., Kijas J., MacLeod I. M., Newbold C. J., Davies L., Larkin D. M. (2015). Population structure and history of the Welsh sheep breeds determined by whole genome genotyping. *BMC Genetics* 16: 65. doi: 10.1186/s12863-015-0216-x
- Biscarini F., Nicolazzi E. L., Stella A., Boettcher P. J., Gandini G. (2015). Challenges and opportunities in genetic improvement of local livestock breeds. *Front. Genet.* 6: 33. doi: 10.3389/fgene.2015.00033
- Broman K. W., Weber J.L. (1999). Long homozygous chromosomal segments in reference families from the Centre d'Etude du polymorphisme humain. *Am J Hum Genet* 65: 1493-1500
- Caballero A. (1994). Developments in the prediction of effective population size. *Heredity* volume 73: 657-679
- Cao Y. H., Xu S. S., Shen M., Chen Z. H., Gao L., Lv F. H., Xie X. L., Wang X. H., Yang H., Liu C. B., Zhou P., Wan P. C., Zhang Y. S., Yang Y. Q., Pi W. H., Hehua E., Berry D. P., Barbato M., Esmailzadeh A., Nosrati M., Salehian-Dehkordi H., Dehghani-Qanatqestani M., Dotsev A. V., Deniskova T. E., Zinovieva N. A., Brem G., Stepanek O., Ciani E., Weimann C., Erhardt G., Mwacharo J. M., Ahbara A., Han J. L., Hanotte O., Miller J. M., Sim Z., Coltman D., Kantanen J., Bruford M. W., Lenstra J. A., Kijas J., Li M. H. (2020). Historical Introgression from Wild Relatives Enhanced Climatic Adaptation and Resistance to Pneumonia in Sheep. *Mol. Biol. Evol.* 38 (3): 838-855. doi:10.1093/molbev/msaa236
- Chessa B., Pereira F., Arnaud F., Amorim A., Goyache F., Mainland I., Kao R. R., Pemberton J. M., Beraldi D., Stear M., Alberti A., Pittau M., Iannuzzi L., Banabazi M. H., Kazwala R., Zhang Y. -P., Arranz J. J., Ali B. A., Wang Z., Uzun M., Dione M., Olsaker I., Holm L. -E., Saarma U., Ahmad S., Marzanov N., Eythorsdottir E., Holland M. J., Ajmone-Marsan P., Bruford M. W., Kantanen J., Spencer T. E., Palmarini M. (2009). Revealing the History of Sheep Domestication Using Retrovirus Integrations. *Science* 324 (5926): 532-536. doi: 10.1126/science.1170587
- Chitneedi P. K., Arranz J. J., Suarez – Vega A., Garcia – Gamez E., Gutierrez – Gil B. (2017). Estimation of linkage disequilibrium, effective population size and ROH – based inbreeding coefficients in Spanish Churra sheep using imputed high – density SNP genotypes. *Stitching International Foundation for Animal Genetics* 48: 436-446. doi: 10.1111/age.12564
- Ciani E., Crepaldi P., Nicoloso L., Lasagna E., Sarti F. M., Moioli B., Napolitano F., Carta A., Usai G., D'Andrea M., Marletta D., Ciampolini R., Riggio V., Occidente M., Matassino D., Kompan D., Modesto P., Macciotta N., Ajmone-Marsan P., Pilla F. (2014). Genome-wide analysis of Italian sheep diversity reveals a strong geographic

- pattern and cryptic relationships between breeds. *Anim Genet* 45 (2): 256-66. doi: 10.1111/age.12106
- Ciani E., Mastrangelo S., Da Silva A., Marroni F., Ferenčaković M., Ajmone-Marsan P., Baird H., Barbato M., Colli L., Delvento C., Dovenski T., Gorjanc G., Hall S. J. G., Hoda A., Li M. H., Marković B., McEwan J., Moradi M. H., Ruiz-Larrañaga O., Ružić-Muslić D., Šalamon D., Simčič M., Stepanek O., Consortium E., Consortium S., Curik I., Cubric-Curik V., Lenstra J. A. (2020). On the origin of European sheep as revealed by the diversity of the Balkan breeds and by optimizing population-genetic analysis tools. *Genet Sel Evol* 52: 25. doi: 10.1186/s12711-020-00545-7
- Colli L., Milanesi M., Talenti A., Bertolini F., Chen M., Crisà A., Daly K. G., Del Corvo M., Guldbbrandtsen B., Lenstra J. A., Rosen B. D., Vajana E., Catillo G., Joost S., Nicolazzi E. L., Rochat E., Rothschild M. F., Servin B., Sonstegard T. S., Steri R., Vnn Tassell C. P., Ajmone-Marsan P., Crepaldi P., Stella A., AdaptMap Consortium. (2018). Genome-wide SNP profiling of worldwide goat populations reveals strong partitioning of diversity and highlights post-domestication migration routes. *Genetics Selection Evolution* 50: 58. doi: 10.1186/s12711-018-0422-x
- Cubric Curik V., Feligni M., Ferencakovic M., Dzidic A., Salajpal K., Ambriovic Ristov A., Cetkovic H., Majhen D., Curik I. (2009). Sequence polymorphism of PrP exon 3 gene in Istrian and crossbred sheep. *Italian Journal of Animal Science* 8 (3): 86-88. doi: 10.4081/ijas.2009.s3.86
- Cubric Curik V., Feligni M., Lukac Havranek J., Curik I., Enne G. (2002). Genetic Polymorphism of β -Lactoglobulin in Native Sheep from the Island of Pag. *Food techol. Biotechnol.* 40 (1): 75-78
- Curik I., Ferenčaković M., Sölkner J. (2014). Inbreeding and runs of homozygosity: a possible solution to an old problem. *Livest Sci.* 166: 26-34. doi: 10.1016/j.livsci.2014.05.034
- Corbin L. J., Liu A. Y. H., Bishop S. C., Woolliams J. A. (2012). Estimation of historical effective population size using linkage disequilibria with marker data. *J.Anim.Breed.Genet.* 129: 257-270. doi: 10.1111/j.1439-0388.2012.01003.x
- Činkulov M., Popovski Z., Porcu K., Tanaskovska B., Hodžić A., Bytyqi H., Mehmeti H., Margeta V., Djedović R., Hoda A., Trailović R., Brka M., Marković B., Važić B., Vegara M., Olsaker I., Kantanen J. (2007). Genetic diversity of the West Balkan Pramenka sheep. U: *Knjiga sažetaka konferencije o izvornim pasminama i sortama kao dijelu prirodne i kulturne baštine.* Šibenik, Hrvatska, str. 65-66
- Čubrić Čurik V. (2005). *Genetski polimorfizam proteina mlijeka ovaca.* Magistarski rad, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

- Čubrić Čurik V. (2009). Raznolikost prionskog gena ovaca hrvatskog priobalja i otoka. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Decker J. E., McKay S. D., Rolf M. M., Kim J. W., Molina Alcalá A., Sonstegard T. S., Hanotte O., Götherström A., Seabury C. M., Praharani L., Babar M. E., Correia de Almeida Regitano L., Yildiz M. A., Heaton M. P., Liu W. S., Lei C. Z., Reecy J. M., Saif-Ur-Rehman M., Schnabel R. D., Taylor J. F. (2014). Worldwide patterns of ancestry, divergence, and admixture in domesticated cattle. *PLoS Genet* 10 (3). doi: 10.1371/journal.pgen.1004254
- Defilipis J. (1966). Neki aspekti regionalne razvijenosti i struktura poljoprivrede Dalmacije s posebnim osvrtom na ovčarstvo. Magistarski rad, Zemun, Jugoslavija
- Deniskova T. E., Dotsev A. V., Lushihina E., Shakhin A., Kunz E., Medugorac I., Reyer H., Wimmers K., Khayatzadeh N., Sölkner J. Sermyagin A., Zhunushev A., Brem G., Zinovieva N. A. (2019). Population Structure and Genetic Diversity of Sheep Breeds in the Kyrgyzstan. *Front. Genet.* 10: 1311. doi: 10.3389/fgene.2019.01311
- Deniskova T. E., Dotsev A. V., Selionova M. I., Kunz E., Medugorac I., Reyer H., Wimmers K., Barbato M., Traspov A. A., Brem G., Zinovieva N. A. (2018). Population structure and genetic diversity of 25 Russian sheep breeds based on whole-genome genotyping. *Genet. Sel. Evol.* 50: 29. doi: 10.1186/s12711-018-0399-5
- Deng J., Xie X. L., Wang D. F., Zhao C., Lv F. H., Li X., Yang J., Yu J. L., Shen M., Gao L., Yang J. Q., Liu M. J., Li W. R., Wang Y. T., Wang F., Li J. Q., Hehua E., Liu Y. G., Shen Z. Q., Ren Y. L., Liu G. J., Chen Z. H., Gorkhali N. A., Rushdi H. E., Salehian-Dehkordi H., Esmailizadeh A., Nosrati M., Paiva S. R., Caetano A. R., Stepanek O., Olsaker I., Weimann C., Erhardt G., Curik I., Kantanen J., Mwacharo J. M., Hanotte O., Bruford M. W., Ciani E., Periasamy K., Amills M., Lenstra J. A., Han J. L., Zhang H. P., Li L., Li M. H. (2020). Paternal Origins and Migratory Episodes of Domestic Sheep. *Current Biology* 30: 4085-4095. doi: 10.1016/j.cub.2020.07.077
- Drzaic I., Brajkovic V., Gianni M., Lukić B., Orehovacki V., Cacic M., Ferencaković M., Curik I., Cubric Curik V. (2020). Genomic analysis of indigenous Croatian sheep breeds based on a high-density SNP chip. U: Book of Abstracts of the 71st Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Virtual Meeting, str. 106
- Drzaic I., Špehar M., ferencakovic M., Oršanić M., Ugarković D., Lukić B., Curik I., Cubric Curik V. (2019). Genomic variation and population structure of Dalmatian Pramenka sheep. U: Book of abstracts of the 27 international Symposium Animal Science Days, Prague, Czech Republic
- Držaić V. (2016). Povezanost polimorfizama MTNR1A gena i sezonske poliestričnosti ovaca. Doktorska dizertacija, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

- Držaić V., Kasap A., Širić I., Mioč B. (2016). Polimorfizmi MTNR1A gena u populaciji travničke pramenke. Proceedings of the 51st Croatian and 11th International Symposium on Agriculture, Opatija, Croatia, str 324-328
- Držaić V., Ramljak J., Kasap A., Širić I., Antunović Z., Mioč B. (2020). Polimorfizmi MTNR1A gena u populaciji istarske ovce. U: Proceedings of the 55th Croatian & 15th International Symposium on Agriculture, Vodice, Croatia, str. 424-427
- Dzomba E. F., Chimonyo M., Pierneef R., Muchadeyi F. C. (2021). Runs of homozygosity analysis of South African sheep breeds from various production systems investigated using OvineSNP50k data. BMC Genomics 22: 7. doi: 10.1186/s12864-020-07314-2
- Edea Z., Dessie T., Dadi H., Do K. T., Kim K. S. (2017). Genetic Diversity and Population Structure of Ethiopian Sheep Populations Revealed by High-Density SNP Markers. Frontiers in Genetics 8:218. doi: 10.3389/fgene.2017.00218
- Edwards C. J., Ginja C., Kantanen J., Pérez-Pardal L., Tresset A., Stock F., European Cattle Genetic Diversity Consortium, Gama L. T., Penedo M. C. T., Bradley D. G., Lenstra J. A., Nijman I. J. (2011). Dual Origins of Dairy Cattle Farming – Evidence from a Comprehensive Survey of European Y-Chromosomal Variation. PLoS ONE 6:1. doi: 10.1371/journal.pone.0015922
- FAO (2015). The second report on the state of the World's animal genetic resources for Food and agriculture. (Scherf B. D., Pilling D., eds.), FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments, Rome, Italy. str. 1-562
- Fariello M. I., Servin B., Tosser-Klopp G., Rupp R., Moreno C., International Sheep Genomics, San Cristobal M., Boitard S. (2014). Selection signatures in worldwide sheep populations. PLoS One 9 (8). doi: 10.1371/journal.pone.0103813
- Feligini M., Vlaco S., Cubric Curik V., Parma P., Greppi G. Enne G. (2005). A single nucleotide polymorphism in the sheep κ -casein coding region. Journal of Dairy Research 72: 317-321
- Ferencakovic M., Curik I., Perez-Pardal L., Royo L. J., Cubric-Curik V., Fernandez I., Alvarez I., Kostelic A., Sprem N., Krapinec K., Goyache F. (2012) Mitochondrial DNA and Y-chromosome diversity in East Adriatic sheep. Animal Genetics 44: 184-92. doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02393.x
- Ferenčaković M., Sölkner J., Curik I. (2013). Estimating autozygosity from high-throughput information: effects of SNP density and genotyping errors. Genetics Selection Evolution 45: 42
- Ferenčaković M., Sölkner J., Kapš M., Curik I. (2017). Genome-wide mapping and estimation of inbreeding depression of semen quality traits in a cattle population. J. Dairy Sci 100 (6): 4721-4730. doi: 10.3168/jds.2016-12164

- Ferenčaković M., Špehar M., Brajkovic V., Drzaic I., Curik I., Cubric Curik V. (2020). Copy number variation analysis of the East Adriatic sheep breeds. U: Book of Abstracts of the 71st Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Virtual Meeting, str. 105
- Ferrando A., Goyache F., Pares P. M., Carrion C., Miro J., Jordana J. (2014). Genetic relationships between six eastern Pyrenean sheep breeds assessed using microsatellites. *Span. J. Agric. Res.* 12: 1029-1037
- Flury C., Tapio M., Sonstegard C., Drogemuller C., Leeb T., Simianer H., Hanotte O., Rieder S. (2010). Effective population size of an indigenous Swiss cattle breed estimated from linkage disequilibrium. *J Anim Breed Genet* 127: 339-347
- Francis R. M. (2017). pophelper: an R package and web app to analyse and visualize population structure. *Mol Ecol Resour* 17: 27-32. doi: 10.1111/1755-0998.12509
- Gandini G. C., Ollivier L., Danell B., Distl O., Georgoudis A., Groeneveld E., Martyniuk E., van Arendonk J. A. M., Woolliams J. A. (2004). Criteria to assess the degree of endangerment of livestock breeds in Europe. *Livestock Prod. Sci.* 91: 173-182. doi: 10.1016/j.livprodsci.2004.08.001
- Gkiasta M., Russell T., Shennan S., Steele J. (2003). Neolithic transition in Europe: the radiocarbon record revisited. *Antiquity* 77: 45-62
- Glowatzki - Mullis M. L., Muntwyler J., Baumle E., Gaillard C. (2009). Genetic diversity of Swiss sheep breeds in the focus of conservation research. *J. Anim. Breed. Genet.* 126: 164-175
- Grasso A. N., Goldberg V., Navajas E. A., Iriarte W., Gimeno D., Aguilar I., Medrano J. F., Rincon G., Ciappesoni G. (2014). Genomic variation and population structure detected by single nucleotide polymorphism arrays in Corriedale, Merino and Creole sheep. *Genetics and Molecular Biology* 37 (2): 389-395
- Groeneveld L. F., Lenstra J. A., Eding H., Toro M. A., Scherf B., Pilling D., Negrini R., Finlay E. K., Jianlin H., Groeneveld E., Weigend S. (2010). Genetic diversity in farm animals—a review. *Animal Genetics* 41: 6-31. doi: 10.1111/j1365-2052.2010.02038.x
- Guerrini M., Forcina M., Panayides P., Lorenzini R., Garel M., Anayiotos P., Kassinis N., Barbanera P. (2015). Molecular DNA identity of the mouflon of Cyprus (*Ovis orientalis ophion*, Bovidae): Near Eastern origin and divergence from Western Mediterranean conspecific populations. *Systematics and Biodiversity* 13 (5): 472-483. doi: 10.1080/14772000.2015.1046409
- Gurgul A, Rubis D., Zabek T., Zukowski K., Pawlina K, Semik E, Bugno-Poniewierska M. (2013). The evaluation of the usefulness of pedigree verification-dedicated SNPs

- for breed assignment in three Polish cattle populations. *Mol. Biol. Rep.* 40: 6803-6809. doi: 10.1007/s11033-013-2797-7
- Gusmao L., Brion M., Gomes I. (2008). The human Y chromosome male-specific polymorphism and forensic genetics. *Handbook of Analytical Separations Volume 6*: 969-1000. Elsevier B.V.
- Hayes B. J., Visscher P. M., McPartlan H. C., Goddard M. E. (2003). Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome Res* 13:635-643. doi: 10.1101/gr.387103
- Hiendleder S., Mainz K., Plante Y., Lewalski H. (1998). Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. *J Hered* 89 (2): 113-20. doi: 10.1093/jhered/89.2.113
- Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu. (2021). *Ovčarstvo, kozarstvo I male životinje: godišnje izvješće za 2020 godinu*. Osijek, Hrvatska
- Hoffmann, I. (2010). Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics* 41: 32-46. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02043.x.
- Horvath Š. (1996). *Hrvatske baštinjene pasmine. Pokret prijatelja prirode »Lijepa naša«*, Zagreb.
- Howrigan D. P., Simonson M. A., Keller M. C. (2011). Detecting autozygosity through runs of homozygosity: a comparison of three autozygosity detection algorithms. *BMC Genomics* 12: 460
- Huson D. H., Bryant D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23: 254-267. doi: 10.1093/molbev/msj030
- Ivanković A., Dovč P., Kavari T., Caput P., Mioč B., Pavić V., Štuhec V., Leto J. (2003). Genetic characterisation of the Pag island sheep breed based on microsatellite and mtDNA data. *Small Ruminant Research* 57: 167-174
- Jardas F. (1951). Dosadašnja iskustva oko merinizacije u NR Hrvatskoj. *Stočarstvo* 3.
- Kasap A., Ramljak J., Špehar M. (2021). Estimation of Population-Specific Genetic Parameters Important for Long-Term Optimum Contribution Selection—Case Study on a Dairy Istrian Sheep Breed. *Animals* 11 (2356): 1-15. doi: 10.3390/ani11082356
- Kawecka A., Gurgul A., Miksza-Cybulska A. (2016). The use of SNP microarrays for biodiversity studies of sheep – a review. *Ann. Anim. Sci.* 16 (4): 975-987. doi: 10.1515/aoas-2016-0017
- Khabisi M. M., Foozi M. A., Lv F. H., Esmailizadeh A. (2021). Genome-wide DNA arrays profiling unravels the genetic structure of Iranian sheep and pattern of admixture

- with worldwide coarse-wool sheep breeds. *Genomics* 113 (6): 3501-3511. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.07.019
- Kijas J. W., Hadfield T., Naval Sanchez M., Cockett N. (2016). Genome-wide association reveals the locus responsible for four-horned ruminant. *Anim Genet* 47 (2): 258-62. doi: 10.1111/age.12409
- Kijas J. W., Lenstra J. A., Hayes B., Boitard S., Neto L. R. P., San Cristobal M., Servin B., McCulloch R., Whan V., Gietzen K., Paiva S., Barendse W., Ciani E., Raadsma H., McEwan J., Dalrymple B., Tyler-Smith C. (2012). Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *Plos Biology* 10 (2): e1001258. doi: 10.1371/journal.pbio.1001258
- Kim E. S., Sonstegard T. S., Van Tassell C. P., Wiggans G., Rothschild M. F. (2015). The Relationship between Runs of Homozygosity and Inbreeding in Jersey Cattle under Selection. *PLoS ONE* 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0129967
- Kirin M., McQuillan R., Franklin C. S., Campbell H., McKeigue P. M., Wilson J. F. (2010). Genomic runs of Homozygosity record population history and consanguinity. *PLoS One* 5 (11). doi: 10.1371/journal.pone.0013996
- Kopelman N. M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N. A., Mayrose I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* 15: 1179-1191. doi: 10.1111/1755-0998.12387
- Krapinec K. (2001). Diet structure of mouflon (*Ovis ammon L.*) and axis deer (*Axis axis Erx.*) on the island of Rab. Master thesis, Faculty of Forestry, University of Zagreb, Zagreb
- Kušac J., Krapinec K. (2010). Ungulates and their management in Croatia. U: *European Ungulates and their management in the 21st century* (ur. Apollonio M., Andersen R., Putman R.). Cambridge University press, UK. str. 527-539
- Lao O., van Duijn K., Kersbergen P., de Knijff P., Kayser M. (2006). Proportioning whole-genome single-nucleotide-polymorphism diversity for the identification of geographic population structure and genetic ancestry. *Am. J. Hum. Genet.* 78: 680-690
- Larson G., Fuller D.Q. (2014). The Evolution of Animal Domestication. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 45 (1): 115-136
- Lawson Handley L. J., Byrne K., Santucci F., Townsend S., Taylor M., Bruford M. W., Hewitt G. M. (2007). Genetic structure of European sheep breeds. *Heredity* 99: 620-631
- Lencz T., Lambert C., DeRosse P., Burdick K. E., Morgan T. V., Kane J. M., Kucherlapati R., Malhotra A. K. (2007). Runs of homozygosity reveal highly penetrant recessive loci in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19942-7

- Lenstra J. A., Groeneveld L. F., Eding H., Kantanen J., Williams J. L., Taberlet P., Nicolazzi E. L., Sölkner J., Simianer H., Ciani E., Garcia J.F., Bruford M. W., Ajmone-Marsan P., Weigend S. (2012). Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. *Anim Genet* 43 (5): 483-502. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02309.x
- Leroy G., Mary-Huard T., Verrier E., Danvy S., Charvolin E., Danchin-Burge C. (2013). Methods to estimate effective population size using pedigree data: Examples in dog, sheep, cattle and horse. *Gen Sel Evol* 45: 1
- Li H., Durbin R. (2011). Inference of human population history from individual whole-genome sequences. *Nature* 475: 493-496
- Litt M., Luty J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics* 44(3): 397-401
- Louhichi N., Medhaffar M., HadjSalem i., Mkaouar-Rebai E., Fendri-Kriaa N., Kanoun H., Yaïch F., Souissi T., Elloumi M., Fakhfakh F. (2010). Congenital factor XIII deficiency caused by two mutations in eight Tunisian families: molecular confirmation of a founder effect. *Ann Hematol* 89: 499-504. doi: 10.1007/s00277-009-0863-y
- Lukic B., Brajkovic V., Drzaic I., Ferenčaković M., Cubric Curik V., Curik I. (2020). Signatures of selection and environmental adaptation across East Adriatic sheep breeds. U: Book of Abstracts of the 71st Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Virtual Meeting, str. 486
- Lv F. H., Cao Y. H., Liu G. J., Luo L. Y., Lu R., Liu M. J., Liu Li, W. R., Zhou P., Wang X. H., Shen M., Gao L., Yang J. Q., Yang H., Yang Y. L., Liu C. B., Wan P. C., Zhang Y. S., Pi W. H., Ren Y. L., Shen Z. Q., Wang F., Wang Y. T., Li J. Q., Salehian-Dehkordi H., Hehua E., Liu Y. G., Chen J. F., Wang J. K., Deng X. M., Esmailizadeh A., Dehghani-Qanatqestani M., Charati H., Nosrati M., Štěpánek O., Rushdi H. E., Olsaker I., Curik I., Gorkhali N. A., Paiva S. R., Caetano A. R., Ciani E., Amills M., Weimann C., Erhardt G., Amane A., Mwacharo J. M., Han J. L., Hanotte O., Periasamy K., Johansson A. M., Hallsson J. H., Kantanen J., Coltman D. W., Bruford M. W., Lenstra J. A., Li M. H. (2021). Whole-genome resequencing of worldwide wild and domestic sheep elucidates genetic diversity, introgression and agronomically important loci. *Molecular biology and evolution* 39 (2), msab353. doi: 10.1093/molbev/msab353
- Macedo F., Navajas E. A., Aguilar I., Grasso A. N., Pieruccioni F., Ciappesoni G. (2014). New Parentage Testing SNP Panel for Commercial Breeds will be a Useful Tool for Conservation of Creole Sheep. *Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*

- Martikainen K., Tyrisevä A. M., Matilainen K., Pösö J., Uimari P. (2017). Estimation of inbreeding depression on female fertility in the Finnish Ayrshire population. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 134 (5): 383-392. doi: 10.1111/jbg.12285
- Marwal A., Sahu A. K., Gaur R. K. (2014). *Molecular Markers: Tool for Genetic Analysis*. U *Animal Biotechnology* (ur, Verma A. S., Sighn A.). Elsevier Academic Press
- Mastrangelo S., Ciani E., Sardina M. T., Sottile G., Pilla F., Portolano B., Bi.Ov. Ita Consortium (2018). Runs of homozygosity reveal genome-wide autozygosity in Italian sheep breeds. *Anim Genet* 49 (1): 71-81. doi: 10.1111/age.12634
- Mastrangelo S., Tolone M., Sardina M. T., Sottile G., Sutera A. M., Di Gerlando R., Portolano B. (2017). Genome-wide scan for runs of homozygosity identifies potential candidate genes associated with local adaptation in Valle del Belice sheep. *Genet Sel Evol* 49: 84. doi: 10.1186/s12711-017-03360-z
- Meadows J. R. S., Cemal I., Karaca O., Gootwine E., Kijas J. W. (2007). Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near east. *Genetics* 175 (3): 1371-1379. doi: 10.1534/genetics.106.068353
- Meadows J. R. S., Hiendleder S., Kijas, J. W. (2011). Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel. *Heredity* 106: 700-6.
- Miller J. M., Poissant J., Kijas J. W., Coltman D. W., International Sheep Genomics Consortium. (2011). A genome-wide set of SNPs detects population substructure and long range linkage disequilibrium in wild sheep. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 314-322
- Mioč B., Ivanković A., Pavić V., Barać Z., Sinković K., Marić I. (2003). Odlike eksterijera i polimorfizmi proteina krvi dubrovačke ovce. *Stočarstvo* 57: 3-11
- Mioč B., Pavić V., Sušić V. (2007). *Ovčarstvo*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb
- Mioč B., Prpić Z., Barać Z., Vnučec I. (2012) *Istarska ovca - hrvatska izvorna pasmina*. Hrvatski savez uzgajivača ovaca i koza. Zagreb
- Mitchell M. (1898). *An introduction to genetic algorithms*. MIT Press, Cambridge
- Mitić N. (1987). *Ovčarstvo*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd
- Montaldo H. H., Meza-Herrera C. A. (1998). Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of Livestock. *Electronic Journal of Biotechnology* 1(2): 1-7
- Mucha S., Bunger L., Conington J. (2015). Genome-wide association study of footrot in Texel sheep. *Genet. Sel. Evol.* 47: 35. doi: 10.1186/s12711-015-0119-3
- Naderi S., Rezaei H. R., Pompanom F., Taberlet P. (2008). The goat domestication process inferred from large-scale mitochondrial DNA analysis of wild and domestic individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 46. doi: 10.1073/pnas.0804782105
- Namroud M. C., Beaulieu J., Juge N., Laroche J., Bousquet J. (2008). Scanning the genome for gene single nucleotide polymorphisms involved in adaptive population differentiation in white spruce. *Mol. Ecol.* 17: 3599-3613

- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590
- Nosrati M., Nanaei H. A., Javanmard A., Esmailizadeh A. (2021). The pattern of runs of homozygosity and genomic inbreeding in world-wide sheep populations, *Genomics* 113 (3): 1407-1415. doi:10.1016/j.ygeno.2021.03.005
- Notter D. R. (1999). The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J Anim Sci* 77: 61-69. doi: 10.2527/1999.77161x
- O'Connell M., Wright J.M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7(3): 331-363
- Pavlinić P. (1936). Paška ovca. *Veterinarski arhiv* 6
- Pembleton L. W., Cogan N. O. I., Forster J. W. (2013). StAMPP: Statistical Analysis of Mixed Ploidy Populations. *Molecular Ecology Resources* 13 (5): 946-952. <doi:10.1111/1755-0998.12129
- Peter C., Bruford M. W., Perez T., Dalamira S., Hewitt G., Erhardt G., *ECONOGENE* (2007). Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *International Society for Animal Genetics* 38: 37-44
- Pickrell J. K., Pritchard J. K. (2012). Inference of population splits and mixtures from genome-wide allele frequency data. *PloS Genet.* 8 (11). doi: 10.1371/journal.pgen.1002967
- Posavi M., Ernoić M., Ozimec R., Poljak F. (2002). Hrvatske pasmine domaćih životinja. Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja, Zagreb
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945-95
- Pryce J. E., Haile-Mariam M., Goddard M. E., Hayes B. J. (2014). Identification of genomic regions associated with inbreeding depression in Holstein and Jersey dairy cattle. *Genet Sel Evol.* 46: 71
- Purfield D.C., McParland S., Wall E., Berry D. P. (2017). The distribution of runs of homozygosity and selection signatures in six commercial meat sheep breeds. *PLoS One* 12. doi: 10.1371/journal.pone.0176780
- Putinja F. (2005). Ovčarstvo. U: *Istarska enciklopedija* (ur, Bertoša M., Matijašić R.). Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb
- R Core Team (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Beč
- Radko A., Rychlik T. (2010). Evaluating the usefulness of polymorphism of 7 microsatellite DNA markers for genetic diversity studies of sheep. *Annals of Animal Science* 10 (4):373-378

- Rako A. (1942). Prinos poznavanju pramenke u okolini Sinja. Veterinarski arhiv 12: 164-208
- Riggio V., Pong - Wong R., Salle G., Usai M. G., Casu S., Moreno C. R., Matika O., Bishop S. C. (2014). A joint analysis to identify loci underlying variation in nematode resistance in three European sheep populations. *J. Anim. Breed. Genet.* 131: 426-436
- Rochus C. M., Jonas E., Johansson A. M. (2020). Population structure of five native sheep breeds of Sweden estimated with high density SNP genotypes. *BMC Genet.* 21: 27. doi: 10.1186/s12863-020-0827-8
- Rochus C. M., Tortereau F., Plisson-Petit F., Gwendal R., Moreno-Romieux C., Tosser-Klopp G., Servin B. (2018). Revealing the selection history of adaptive loci using genome-wide scans for selection: an example from domestic sheep. *BMC Genomics* 19: 71. doi: 10.1186/s12864-018-4447-x
- Rosenberg N. A., Pritchard J. K., Weber J. L., Cann H. M., Kidd K. K., Zhivotovsky L. A., Feldman M. W. (2002). Genetic structure of human populations. *Science* 298: 2381-5. doi: 10.1126/science.1078311
- Salamon D., Gutierrez-Gil B., Arranz J. J., Barreta J., Batinic V., Dzidic A. (2014). Genetic diversity and differentiation of 12 eastern Adriatic and western Dinaric native sheep breeds using microsatellites. *Animal* 8 (2): 200-207. doi:10.1017/S1751731113002243
- Salamon D., Gutierrez-Gil B., Kostelic A., Gorjanc G., Kompan D., Dzidic A. (2012). Preliminary study on the genetic diversity of the Istrian sheep, Lika and Krk pramenka sheep populations using microsatellite markers. *Acta agriculture Slovenica, Supplement 3*, 125-129
- Salamon D., Gutierrez-Gil B., Simcic M., Kompan D., Dzidic A. (2015). Microsatellite based genetic structure of regional transboundary Istrian sheep breed populations in Croatia and Slovenia. *Mljekarstvo* 65 (1): 39-47
- Santiago E., Novo I., Pardiñas A. F., Saura M., Wang J., Caballero A. (2020). Recent Demographic History Inferred by High-Resolution Analysis of Linkage Disequilibrium. *Molecular Biology and Evolution* 37 (12): 3642-3653. doi: 10.1093/molbev/msaa169
- Sargolzaei M., Schenkel F. S., Jansen G. B., Schaeffer L. R. (2008). Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America. *J Dairy Sci* 91: 2106-2117
- Sheriff O., Alemayehu K. (2018). Genetic diversity studies using microsatellite markers and their contribution in supporting sustainable sheep breeding programs: A review. *Cogent Food & Agriculture* 4:1. doi: 10.1080/23311932.2018.1459062

- Shihabi M., Lukic B., Cubric Curik V., Brajkovic V., Oršanić M., Ugarković D., Vostry L., Curik I. (2022). Identification of selection signals on the x-chromosome in East Adriatic sheep: a new complementary approach. *Front. Genet.* 13, 1-13. doi: 10.3389/fgene.2022.887582
- Shihabi M., Lukic B., Drzaic I., Ferencakovic M., Brajkovic V., Vostry L., Cubric Curik V., Curik I. (2021). Identification of selection signatures on the X chromosome in East Adriatic sheep. U: Abstract book of the ISAG 2021 Annual Meeting, virtual conference, str. 6
- SNP & Variation Suite™ (Version 8.7.0). Bozeman, MT: Golden Helix, Inc. Dostupno na: <http://www.goldenhelix.com>
- Souza C. A., Paiva S. R., McManus C. M., Azevedo H. C., Mariante A. S., Grattapaglia D. (2012). Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. *Genet Mol Res* 11 (2): 1217-1229. doi: 10.4238/2012.May.8.4
- Su R., Qiao X., Gao Y., Li X., Jiang W., Chen W., Fan Y., Zheng B., Zhang Y., Liu Z., Wang R., Wang Z., Wang Z., Wan W., Dong Y., Li J. (2020). Draft Genome of the European Mouflon (*Ovis orientalis musimon*). *Front. Genet.* 11: 533611. doi: 10.3389/fgene.2020.533611
- Sved J. A. (1971). Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theor Popul Biol* 2:125-141. doi:10.1016/0040-5809(71)90011-6
- Sved J. A., Feldman M. W. (1973). Correlation and probability methods for one and two loci. *Theoretical population biology* 4 (1): 129-32
- Šalamon D., Ferencaković M., Drzaic I., Ciani E., Lenstra J. A., Curik I., Cubric-Curik V. (2018). The conservation status of Dalmatian pramenka sheep using high-throughput molecular information. U Book of Abstract of the EAAP – 69th Annual Meeting, Dubrovnik, Croatia, str. 166
- Špehar M., Kasap A., Ramljak J. (2022). Estimation of genetic parameters and the effect of inbreeding on dairy traits in Istrian sheep. *Italian Journal of Animal Science* 21 (1): 331-342. doi: 10.1080/1828051X.2022.2031320
- Tapio M., Marzanov N., Ozerov M., Cinkulov M., Gonzarenko G., Kiselyova T., Murawski M., Viinalass H. & Kantanen J. (2006). Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Molecular Biology and Evolution* 23 (9):1776-1783. doi:10.1093/molbev/msl043
- Tapio M., Ozerov M., Tapio I., Toro M. A., Marzanov N., Cinkulov M., Goncharenko G., Kiselyova T., Murawski M., Kantanen J. (2010). Microsatellite-based genetic diversity and population structure of domestic sheep in northern Eurasia. *BMC Genet.* 11: 76. doi: 10.1186/1471-2156-11-76

- Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17(16): 6463-6471
- Tenesa A., Navarro P., Hayes B. J., Duffy D. L., Clarke G. M., Goddard M. E., Visscher P. M. (2007). Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. *Genome Research* 17: 520-526
- Trask A. E., Bignal E. M., McCracken D. I., Piertney S. B., Reid J. M. (2017). Estimating demographic contributions to effective population size in an age-structured wild population experiencing environmental and demographic stochasticity. *J Anim Ecol.* 86: 1082-1093. doi: 10.1111/1365-2656.12703
- Vigne J. D., Carrère I., Briois F., Guilaine J. (2009). The Early Process of Mammal Domestication in the Near East. *Curr. Anthropol.* 52: 55-271
- Wang J., Santiago E., Caballero A. (2016). Prediction and estimation of effective population size. *Heredity* 117: 193-206. doi: 10.1038/hdy.2016.43
- Wright S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159
- Zeder M. A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (33): 11597-604. doi: 10.1073/pnas.0801317105
- Zhao F., McParland S., Kearney F., Du L., Berry D. P. (2015). Detection of selection signatures in dairy and beef cattle using high-density genomic information. *Genet Sel Evol.* 47: 49. doi: 10.1186/s12711-015-0127-3
- Zheng X., Levine D., Shen J., Gogarten S., Laurie C., Weir B. (2012). A High-performance Computing Toolset for Relatedness and Principal Component Analysis of SNP Data. *Bioinformatics* 28 (24): 3326-3328. doi: 10.1093/bioinformatics/bts606

8. ŽIVOTOPIS

Ivana Držaić rođena je 31.08.1986. u Vukovaru. Osnovnu školu i opću gimnaziju završila je u Rovinju. Preddiplomski studij Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2005. godine i 2008. godine stječe titulu sveučilišnog prvostupnika. Iste godine upisuje diplomski studij Genetika i oplemenjivanje životinja te 2010. godine stječe titulu magistra inženjerka genetike i oplemenjivanja životinja. Od 2012. godine zaposlena je na Agronomskom fakultetu na Zavodu za opće stočarstvo kao stručni suradnik. Bila je suradnik na Horizon 2020-TWINN projektu "MendTheGap" – Smart Integration of Genetics with Sciences of the Past in Croatia: Minding and Mending the Gap u sklopu kojeg je sudjelovala na nekoliko radionica i ljetnih škola u svrhu usavršavanja analiza iz područja genetike i zooarheologije. Također, sudjelovala je u izvođenju projekta Uspostava laboratorija za arheogenetiku Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu - u okviru "Razvoj i jačanje sinergija s horizontalnim aktivnostima programa OBZOR 2020: Twinning i ERA Chairs" i suradnik je na HRZZ projektu "Primjena NGS metoda u procjeni genomske varijabilnosti preživača" – "ANAGRAMS" u sklopu kojeg je izradila disertaciju. Kao suradnik na četiri modula preddiplomskih i diplomskih studija, bila je uključena u održavanje vježbi. Kao autor ili koautor, do sada je objavila ukupno jedan znanstveni rad indeksiran u a1 bazi i dva rada u a2 bazi. Sudjelovala je na četiri međunarodne konferencije s usmenim izlaganjima.

Popis objavljenih znanstvenih radova:

Znanstveni radovi iz skupine a1:

1. Držaić I., Čurik I., Novosel D., Čubrić Čurik V. (2019). Maternal variability of Croatian Spotted goat (*Capra hircus*). *Czech journal of animal science* 64: 248-254. doi: 10.17221/240/2018
2. Drzaic Ivana, Curik Ino, Lukic Boris, Shihabi Mario, Li Meng-Hua, Kantanen Juha, Mastrangelo Salvatore, Ciani Elena, Lenstra Johannes A., Cubric-Curik Vlatka. (2022). High-density genomic characterization of native Croatian sheep breeds (podnesen)

Znanstveni radovi iz skupine a2:

1. Janeš M., Brajković V., Držaić I., Zorc M., Dovč P., Čubrić Čurik V. (2019). Mitochondrial variability of Small Međimurje dog. *Agriculturae conspectus scintificus* 84 (2): 203-209
2. Čačić M., Orehovački V., Ećimović M., Jankovich Bésán E., Moler L., Drzaic I., Cubric-Curik V., Curik I. (2018). Finding 'the long-lost' Croatian Lipizzan mare families. *Acta fytotechnica et zootechnica* 21 (4): 169-172. doi: 10.15414/afz.2018.21.04.169-172

9. PRILOZI

Prilog 1. Opisna statistika hrvatskih izvorni pasmina. U tablici su prikazane oznake uzoraka, pasmina, lokacija uzorkovanja, spol te geografske koordinate za svaku jedinku hrvatske izvorne pasmine ovaca korištene u ovom doktorskom radu

Oznaka uzorka	Pasmina	Spol	Mjesto uzorkovanja	Geografska širina	Geografska dužina
C156	creska ovca	F	Cres	44,961749	14,409676
C158	creska ovca	F	Cres	44,961749	14,409676
C159	creska ovca	F	Cres	44,961749	14,409676
C160	creska ovca	M	Cres	44,961749	14,409676
C161	creska ovca	M	Mali Lošinj	44,530082	14,476145
C162	creska ovca	F	Mali Lošinj	44,530082	14,476145
C163	creska ovca	M	Mali Lošinj	44,530082	14,476145
C164	creska ovca	M	Mali Lošinj	44,530082	14,476145
C165	creska ovca	F	Mali Lošinj	44,534061	14,469509
C166	creska ovca	F	Mali Lošinj	44,534061	14,469509
C167	creska ovca	F	Mali Lošinj	44,534061	14,469509
C169	creska ovca	F	Mali Lošinj	44,534061	14,469509
C170	creska ovca	F	Mali Lošinj	44,534061	14,469509
C171	creska ovca	F	Mali Lošinj	44,534061	14,469509
C174	creska ovca	F	Mali Lošinj	44,534061	14,469509
C175	creska ovca	F	Mali Lošinj	44,534171	14,469651
C176	creska ovca	M	Mali Lošinj	44,534171	14,469651
C177	creska ovca	F	Cres	44,883939	14,424565
C178	creska ovca	F	Cres	44,883939	14,424565
C180	creska ovca	M	Cres	44,883939	14,424565

Oznaka uzorka	Pasmina	Spol	Mjesto uzorkovanja	Geografska širina	Geografska dužina
D133	dalmatinska pramenka	F	Nerežišća	43,3140019	16,5236901
D134	dalmatinska pramenka	F	Visoka	45,0415955	18,6535643
D135	dalmatinska pramenka	F	Mirlović Zagora	43,7655692	16,0896263
D136	dalmatinska pramenka	M	Gornje Planjane	43,7683363	16,191587
D137	dalmatinska pramenka	F	Kaočine	43,8602502	16,0636727
D138	dalmatinska pramenka	F	Nevest	43,725460	16,218692
D139	dalmatinska pramenka	F	Nevest	43,725243	16,217963
D140	dalmatinska pramenka	F	Nevest	43,727445	16,212031
D141	dalmatinska pramenka	F	Gornje Utore	43,706283	16,267638
D142	dalmatinska pramenka	F	Gornje Planjane	43,767728	16,194072
IMO141	dalmatinska pramenka	M	Slivno, Imotski	43,3385821	17,2311234999
IMO154	dalmatinska pramenka	M	Svib, Imotski	43,55	16,96
IMO166	dalmatinska pramenka	F	Svib, Imotski	43,55	16,96
IMO38	dalmatinska pramenka	M	Ričice, Imotski	43,5154068	17,1057221999
IMO59	dalmatinska pramenka	M	Ričice, Imotski	43,5154068	17,1057221999
IMO66	dalmatinska pramenka	M	Ričice, Imotski	43,5154068	17,1057221999
SO118	dalmatinska pramenka	M	Podumci	43,736265	16,135097
SO123	dalmatinska pramenka	F	Gornje Utore	43,705704	16,267648
SO35	dalmatinska pramenka	M	Pakovo Selo	43,822011	16,071372
SO70	dalmatinska pramenka	M	Mirlović Zagora	43,763894	16,071839
ZO105	dalmatinska pramenka	M	Podumci	43,736265	16,135097
ZO122	dalmatinska pramenka	F	Gornje Utore	43,705704	16,267648
ZO126	dalmatinska pramenka	F	Gornje Utore	43,705704	16,267648
ZO129	dalmatinska pramenka	M	Gornje Utore	43,705704	16,267648
ZO34	dalmatinska pramenka	F	Pakovo Selo	43,822011	16,071372
ZO69	dalmatinska pramenka	M	Mirlović Zagora	43,763894	16,071839

Oznaka uzorka	Pasmina	Spol	Mjesto uzorkovanja	Geografska širina	Geografska dužina
DR121	dubrovačka ovca	F	Dubrovnik	42,659256	18,147009
DR130	dubrovačka ovca	M	Dubrovnik	42,659256	18,147009
DR138	dubrovačka ovca	F	Dubrovnik	42,659256	18,147009
DR139	dubrovačka ovca	M	Dubrovnik	42,659256	18,147009
DR146	dubrovačka ovca	F	Imotica	42,914390	17,684580
DR147	dubrovačka ovca	F	Topolo	42,908720	17,707100
DR148	dubrovačka ovca	F	Imotica	42,913970	17,685090
DR149	dubrovačka ovca	F	Mlini	42,640698	18,195950
DR150	dubrovačka ovca	F	Martinovići	42,651432	18,184073
DR151	dubrovačka ovca	F	Kuna Pelješka	42,966753	17,346229
DR152	dubrovačka ovca	F	Otrić seoci	43,155959	17,458972
DR153	dubrovačka ovca	F	Osojnik	42,652214	18,096753
DR154	dubrovačka ovca	F	Gornje Obuljeno	42,678359	18,109480
DR155	dubrovačka ovca	F	Blato	42,767044	17,475883
DR156	dubrovačka ovca	F	Pločice	42,420415	18,485576
DR157	dubrovačka ovca	F	Česvinica	42,849636	17,667508
DR158	dubrovačka ovca	F	Štedrica	42,892446	17,684017
DR159	dubrovačka ovca	F	Štedrica	42,894074	17,681519
DR160	dubrovačka ovca	F	Trnovica	42,889942	17,838175
DR18	dubrovačka ovca	M	Pelješac	42,875267	17,529728
DR23	dubrovačka ovca	M	Pelješac	42,875267	17,529728
DR32	dubrovačka ovca	F	Pelješac	42,875267	17,529728
DR51	dubrovačka ovca	M	Pelješac	42,875267	17,529728
DR7	dubrovačka ovca	F	Pelješac	42,875267	17,529728
DR77	dubrovačka ovca	F	Dubrovnik	42,659256	18,147009
DR84	dubrovačka ovca	M	Dubrovnik	42,659256	18,147009

Oznaka uzorka	Pasmina	Spol	Mjesto uzorkovanja	Geografska širina	Geografska dužina
IO 18	istarska ovca	M	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO 36	istarska ovca	F	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO 42	istarska ovca	M	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO 44	istarska ovca	M	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO104	istarska ovca	F	Svetvincenat	45,013222	13,848607
IO199	istarska ovca	F	Slum	45,360839	14,058960
IO200	istarska ovca	F	Slum	45,360839	14,058960
IO201	istarska ovca	F	Krmed	45,084907	13,825787
IO202	istarska ovca	F	Svetvincenat	45,013222	13,848607
IO203	istarska ovca	F	Boljunsko polje	45,297998	14,133345
IO205	istarska ovca	F	Tar	45,316611	13,628946
IO206	istarska ovca	F	Loborika	44,920251	13,909156
IO207	istarska ovca	F	Loborika	44,920251	13,909156
IO208	istarska ovca	F	Šajini	45,031728	13,942707
IO32	istarska ovca	F	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO60	istarska ovca	F	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO63	istarska ovca	M	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO64	istarska ovca	M	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO65	istarska ovca	M	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO66	istarska ovca	M	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO67	istarska ovca	M	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO68	istarska ovca	M	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO69	istarska ovca	M	Oprtalj	45,398974	13,879502
IO77	istarska ovca	M	Svetvinčenat	45,013222	13,848607
IO85	istarska ovca	M	Svetvinčenat	45,013222	13,848607
K138	krčka ovca	F	Vrbnik	45,075877	14,675198

Oznaka uzorka	Pasmina	Spol	Mjesto uzorkovanja	Geografska širina	Geografska dužina
K140	krčka ovca	F	Vrbnik	45,075877	14,675198
K141	krčka ovca	M	Vrbnik	45,075877	14,675198
K142	krčka ovca	M	Vrbnik	45,075877	14,675198
K143	krčka ovca	F	Vrbnik	45,075877	14,675198
K144	krčka ovca	F	Vrbnik	45,075877	14,675198
K146	krčka ovca	M	Vrbnik	45,075877	14,675198
K147	krčka ovca	F	Kornić	45,042930	14,610160
K148	krčka ovca	F	Kornić	45,042930	14,610160
K149	krčka ovca	F	Kornić	45,042930	14,610160
K151	krčka ovca	M	Kornić	45,042930	14,610160
K152	krčka ovca	M	Kornić	45,042930	14,610160
K153	krčka ovca	M	Kornić	45,042930	14,610160
K154	krčka ovca	F	Kornić	45,042930	14,610160
K155	krčka ovca	F	Vrbnik	45,075975	14,675338
K156	krčka ovca	F	Vrbnik	45,075975	14,675338
K157	krčka ovca	F	Vrbnik	45,075975	14,675338
K158	krčka ovca	F	Vrbnik	45,075975	14,675338
K161	krčka ovca	F	Vrbnik	45,075975	14,675338
K162	krčka ovca	M	Draga Bašćanska	44,999105	14,709954
LP311	lička pramenka	M	Ladevnjak	45,413065	15,591725
LP312	lička pramenka	M	Vrelo Koreničko	44,763445	15,685120
LP314	lička pramenka	M	Frkašić	44,692126	15,808173
LP315	lička pramenka	M	Smiljan	44,563019	15,321368
LP316	lička pramenka	M	Homoljac	44,773234	15,625069
LP317	lička pramenka	M	Komić	44,457955	15,729439
LP318	lička pramenka	M	Debelo Brdo	44,667061	15,693453

Oznaka uzorka	Pasmina	Spol	Mjesto uzorkovanja	Geografska širina	Geografska dužina
LP319	lička pramenka	M	Bjelopolje	44,744034	15,706583
LP320	lička pramenka	M	Bunić	44,671727	15,611614
LP323	lička pramenka	M	Oravac	44,726648	15,715679
LP324	lička pramenka	M	Kalebovac	44,737678	15,707928
LP325	lička pramenka	M	Rudopolje Bruvanjsko	44,393690	15,826690
LP326	lička pramenka	M	Gračac	44,264571	15,830730
LP327	lička pramenka	M	Gospić	44,552209	15,356270
LP328	lička pramenka	M	Perušić	44,672303	15,435755
LP329	lička pramenka	M	Mušaluk	44,605288	15,366651
LP330	lička pramenka	M	Korenica	44,686323	15,807646
LP331	lička pramenka	F	Duga Resa	45,493552	15,454675
LP334	lička pramenka	F	Glina	45,364957	16,069845
LP335	lička pramenka	F	Donji Budački	45,366003	15,594921
PO19	paška ovca	M	Vrčići	44,383278	15,138955
PO199	paška ovca	M	Kolan	44,495566	14,958844
PO200	paška ovca	M	Kolan	44,495567	14,958845
PO201	paška ovca	M	Kolan	44,495568	14,958846
PO202	paška ovca	M	Kolan	44,495569	14,958847
PO203	paška ovca	M	Kolan	44,495570	14,958848
PO204	paška ovca	M	Kolan	44,495571	14,958849
PO205	paška ovca	M	Kolan	44,495572	14,958850
PO206	paška ovca	M	Kolan	44,495573	14,958851
PO212	paška ovca	M	Kolan	44,495574	14,958852
PO213	paška ovca	M	Kolan	44,495575	14,958853
PO214	paška ovca	M	Kolan	44,495576	14,958854
PO215	paška ovca	M	Kolan	44,495577	14,958855

Oznaka uzorka	Pasmina	Spol	Mjesto uzorkovanja	Geografska širina	Geografska dužina
PO216	paška ovca	M	Kolan	44,495578	14,958856
PO218	paška ovca	M	Kolan	44,495579	14,958857
PO219	paška ovca	M	Kolan	44,495580	14,958858
PO222	paška ovca	M	Kolan	44,495581	14,958859
PO223	paška ovca	M	Kolan	44,495582	14,958860
PO226	paška ovca	M	Kolan	44,495583	14,958861
PO227	paška ovca	M	Kolan	44,495584	14,958862
PO228	paška ovca	M	Kolan	44,495585	14,958863
PO41	paška ovca	F	Novalja	44,559501	14,881246
PO45	paška ovca	F	Novalja	44,559501	14,881246
PO46	paška ovca	M	Novalja	44,559501	14,881246
PO47	paška ovca	M	Novalja	44,559501	14,881246
PO49	paška ovca	M	Novalja	44,559501	14,881246
PO61	paška ovca	F	Kolan	44,493964	14,961070
PO62	paška ovca	F	Kolan	44,491025	14,962611
PO63	paška ovca	F	Šimuni	44,467518	14,961267
PO64	paška ovca	F	Novalja	44,550788	14,886053
PO65	paška ovca	F	Šimuni	44,467524	14,961235
PO66	paška ovca	F	Kolan	44,493964	14,961070
PO67	paška ovca	F	Novalja	44,556922	14,883552
PO68	paška ovca	F	Gajac	44,534450	14,892964
PO69	paška ovca	F	Kolan	44,497476	14,958223
PO70	paška ovca	F	Šimuni	44,469624	14,956565
PO8	paška ovca	F	Vrčići	44,383278	15,138955
POG12	paška ovca	M	Kolan	44,491025	14,962611
POG14	paška ovca	M	Kolan	44,491025	14,962611

Oznaka uzorka	Pasmina	Spol	Mjesto uzorkovanja	Geografska širina	Geografska dužina
POG15	paška ovca	M	Kolan	44,491025	14,962611
POG17	paška ovca	M	Kolan	44,495120	14,958922
POG22	paška ovca	M	Kolan	44,494671	14,960181
POG24	paška ovca	M	Kolan	44,494671	14,960181
POG3	paška ovca	M	Kolan	44,495585	14,958863
POG8	paška ovca	M	Kolan	44,499357	14,955732
R170	rapska ovca	F	Rab	44,797284	14,733543
R171	rapska ovca	M	Rab	44,805470	14,725080
R172	rapska ovca	F	Rab	44,805470	14,725080
R173	rapska ovca	F	Rab	44,760618	14,759396
R174	rapska ovca	F	Rab	44,761380	14,756950
R175	rapska ovca	M	Rab	44,765756	14,768272
R178	rapska ovca	F	Rab	44,742672	14,793874
R179	rapska ovca	M	Rab	44,742672	14,793874
R180	rapska ovca	F	Rab	44,772212	14,765982
R182	rapska ovca	F	Rab	44,740318	14,799108
R183	rapska ovca	F	Rab	44,735288	14,806335
R184	rapska ovca	F	Rab	44,761201	14,756943
R185	rapska ovca	M	Rab	44,770078	14,765331
R186	rapska ovca	F	Rab	44,760919	14,759448
R187	rapska ovca	F	Rab	44,746981	14,787656
R189	rapska ovca	M	Rab	44,753127	14,774545
R190	rapska ovca	M	Rab	44,803069	14,727007
R191	rapska ovca	F	Rab	44,803069	14,727007
R192	rapska ovca	M	Rab	44,752470	14,775307
R193	rapska ovca	M	Rab	44,736215	14,801059

Oznaka uzorka	Pasmina	Spol	Mjesto uzorkovanja	Geografska širina	Geografska dužina
SMK 1b	makedonska pramenka		Tetovo, Sjeverna Makedonija	42,063400	20,936687
SMK 2b	makedonska pramenka		Tetovo, Sjeverna Makedonija	42,063400	20,936687
SMK 3b	makedonska pramenka		Tetovo, Sjeverna Makedonija	42,063400	20,936687
SMK 4b	makedonska pramenka		Tetovo, Sjeverna Makedonija	42,063400	20,936687
SMK 5	makedonska pramenka		Tetovo, Sjeverna Makedonija	42,063400	20,936687
SMK 6	makedonska pramenka		Tetovo, Sjeverna Makedonija	42,063400	20,936687
SMK 7b	makedonska pramenka		Tetovo, Sjeverna Makedonija	42,063400	20,936687
SMK 9b	makedonska pramenka		Tetovo, Sjeverna Makedonija	42,063400	20,936687
MR24	muflon	M	Kalifront, Rab	44,781835	14,691458
MR25	muflon	M	Kalifront, Rab	44,781835	14,691458
MR28	muflon	M	Kalifront, Rab	44,781835	14,691458
MR30	muflon	M	Kalifront, Rab	44,781835	14,691458
MR34	muflon	M	Kalifront, Rab	44,781835	14,691458
MR40	muflon	F	Kalifront, Rab	44,781835	14,691458
MR43	muflon	F	Kalifront, Rab	44,781835	14,691458
MR46	muflon	F	Kalifront, Rab	44,781835	14,691458
MR47	muflon	F	Kalifront, Rab	44,781835	14,691458
MR50	muflon	F	Kalifront, Rab	44,781835	14,691458

Prilog 2. Dodatni uzorci korištenih u ovom doktorskom radu. U tablici je prikazano porijeklo pasmina, ime pasmine, oznaka pasmine, izvor iz kojeg su preuzeti genotipovi, broj uzoraka i geografske oznake

Porijeklo pasmine	Ime pasmine	Oznaka	Izvor podataka	Broj uzoraka	Geografske oznake	
					Širina (°N)	Dužina (°E)
Češka	Valachian	VAL	Cao i sur. (2020)	8	49,82	15,47
Češka	Sumavska	SUM	Cao i sur. (2020)	8	49,82	15,47
Francuska	Merino	MER	Kijas i sur. (2014)	36	-25,274398	133,775136
Francuska	Noire du Velay	NVE	Rochus i sur. (2018)	19	45,009346	3,775932
Francuska	Causse du Lot	CDL	Rochus i sur. (2018)	20	44,799383	1,617901
Francuska	Rava	RAV	Rochus i sur. (2018)	20	45,777222	3,087025
Francuska	Blanche du Massif Central	BMC	Rochus i sur. (2018)	20	44,517611	3,501873
Francuska	Meat Lacaune	LAM	Rochus i sur. (2018)	34	43,974566	2,992022
Francuska	Dairy Lacaune	LAC	Rochus i sur. (2018)	36	43,974566	2,992022
Francuska	Limousine	LIM	Rochus i sur. (2018)	18	45,6424049	2,094306
Francuska	Tarasconnaise	TAR	Rochus i sur. (2018)	15	42,848524	1,604815
Francuska	Corse	COR	Rochus i sur. (2018)	16	42,104248	9,5124289
Francuska	Manech Tête Rouge	MTR	Rochus i sur. (2018)	25	43,329845	-1,406347
Francuska	Préalpes du Sud	PAS	Rochus i sur. (2018)	17	44,194713	5,943191
Francuska	Mourerous	MOU	Rochus i sur. (2018)	16	44,089224	6,853764
Italija	Altamura	ALT	Cao i sur. (2020)	15	41,1171432	16,8718715
Italija	Leccese	LEC	Cao i sur. (2020)	15	40,7928393	17,1011931
Srbija	Pramenka	PRA	Cao i sur. (2020)	14	44,74	20,44
Ukrajina	Carpathian Mountain	MKS	Cao i sur. (2020)	13	48,55	23,01

Prilog 3. Parametri procjene čistoće DNA i koncentracija DNA.

Pasmina	Uzorak	A260/A280	A260/A230	Koncentracija (ng/μl)
creska ovca	C156	1,951	1,143	40
creska ovca	C158	1,862	1,895	54
creska ovca	C159	1,857	1,696	58,5
creska ovca	C160	1,898	1,55	46,5
creska ovca	C161	1,923	1,887	50
creska ovca	C162	1,923	1,923	50
creska ovca	C163	1,891	1,776	43,5
creska ovca	C164	1,87	1,554	50,5
creska ovca	C165	1,932	1,7	42,5
creska ovca	C166	1,926	1,891	52
creska ovca	C167	1,92	2,286	48
creska ovca	C169	1,922	1,531	49
creska ovca	C170	1,864	2	55
creska ovca	C171	1,885	1,782	49
creska ovca	C174	1,9	1,928	66,5
creska ovca	C175	1,895	1,714	54
creska ovca	C176	1,873	1,967	59
creska ovca	C177	1,93	1,719	55
creska ovca	C178	1,888	2,104	101
creska ovca	C180	1,899	1,807	75
krčka ovca	K138	1,955	1,911	43
krčka ovca	K140	1,905	1,702	40
krčka ovca	K141	1,914	1,811	33,5
krčka ovca	K142	1,927	1,795	39,5
krčka ovca	K143	1,909	1,585	42
krčka ovca	K144	1,9	1,557	47,5
krčka ovca	K146	1,889	1,889	51
krčka ovca	K147	1,933	1,812	43,5
krčka ovca	K148	1,843	1,593	47
krčka ovca	K149	1,977	1,7	42,5
krčka ovca	K151	1,925	1,711	38,5
krčka ovca	K152	1,93	1,627	41,5
krčka ovca	K153	1,909	1,944	52,5
krčka ovca	K154	1,909	2,019	52,5
krčka ovca	K155	1,904	1,868	49,5
krčka ovca	K156	1,937	1,979	46,5
krčka ovca	K157	1,905	1,818	40
krčka ovca	K158	1,949	1,949	38
krčka ovca	K161	1,911	1,654	43
krčka ovca	K162	1,879	1,879	54,5
lička pramenka	LP311	1,905	1,455	40
lička pramenka	LP312	1,902	1,565	48,5
lička pramenka	LP314	1,883	1,738	56,5

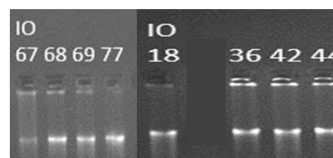
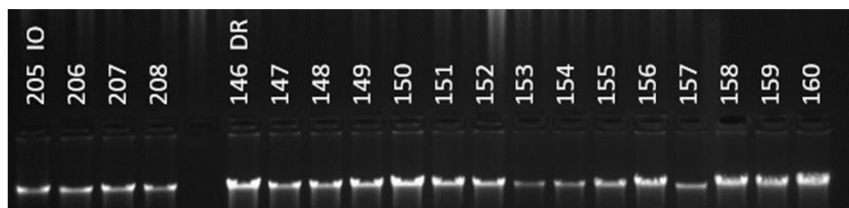
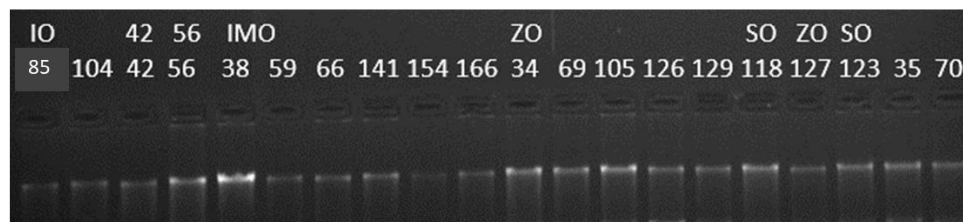
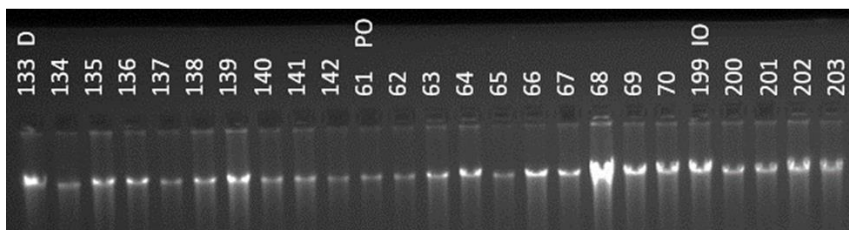
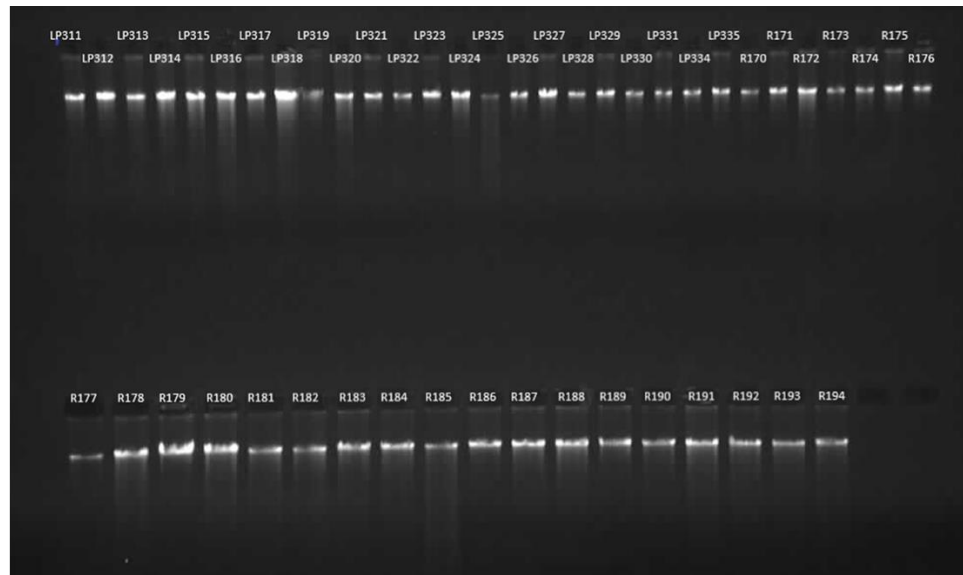
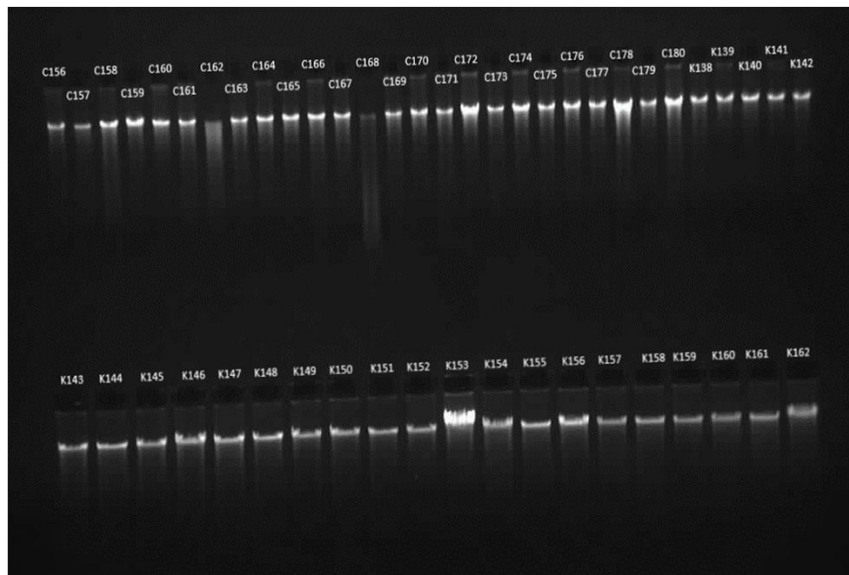
Pasmina	Uzorak	A260/A280	A260/A230	Koncentracija (ng/μl)
lička pramenka	LP315	1,9	1,667	47,5
lička pramenka	LP316	1,909	1,522	52,5
lička pramenka	LP317	1,978	1,517	45,5
lička pramenka	LP318	1,895	1,688	54
lička pramenka	LP319	1,903	1,612	68,5
lička pramenka	LP320	1,932	1,491	42,5
lička pramenka	LP323	1,967	1,475	29,5
lička pramenka	LP324	1,907	1,783	41
lička pramenka	LP325	2	2	17
lička pramenka	LP327	1,943	1,744	34
lička pramenka	LP326	1,923	1,316	25
lička pramenka	LP328	3,4	0,895	17
lička pramenka	LP329	2	1,588	27
lička pramenka	LP330	2	1,6	20
lička pramenka	LP331	2,095	1,158	22
lička pramenka	LP334	1,917	1,437	23
lička pramenka	LP335	1,933	1,487	29
rapaska ovca	R170	2,154	0,848	28
rapaska ovca	R171	2	1,19	25
rapaska ovca	R172	1,872	1,571	44
rapaska ovca	R173	2,059	1,25	17,5
rapaska ovca	R174	1,812	0,817	29
rapaska ovca	R175	1,966	1,583	28,5
rapaska ovca	R178	1,918	1,593	47
rapaska ovca	R179	1,932	2	57
rapaska ovca	R180	1,895	2	54
rapaska ovca	R182	1,86	1,25	40
rapaska ovca	R183	2,05	1,344	41
rapaska ovca	R184	1,949	1,617	38
rapaska ovca	R185	1,895	1,846	36
rapaska ovca	R186	1,921	1,46	36,5
rapaska ovca	R187	1,918	1,741	47
rapaska ovca	R189	2	1,824	31
rapaska ovca	R190	1,939	1,882	32
rapaska ovca	R191	2,179	1,491	42,5
rapaska ovca	R192	1,917	1,683	34,5
rapaska ovca	R193	1,298	0,961	37
paška ovca	PO199	1,941	1,941	66
paška ovca	PO200	1,947	1,881	55,5
paška ovca	PO201	1,892	1,918	70
paška ovca	PO202	1,925	1,925	77
paška ovca	PO203	1,926	1,902	78
paška ovca	PO204	1,94	2,176	80,5
paška ovca	PO205	1,898	2	93
paška ovca	PO206	1,923	1,603	62,5

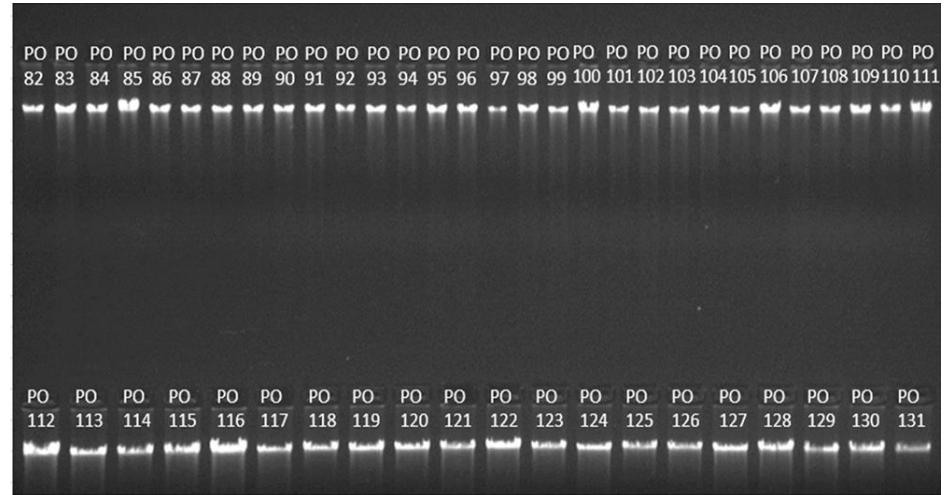
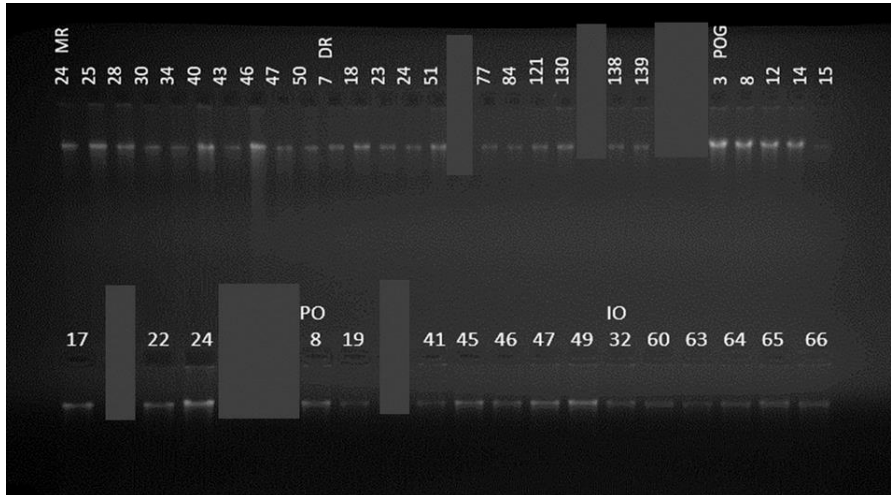
Pasmina	Uzorak	A260/A280	A260/A230	Koncentracija (ng/μl)
paška ovca	PO212	1,908	1,726	72,5
paška ovca	PO213	1,913	2	110
paška ovca	PO214	1,916	2,151	114
paška ovca	PO215	1,932	1,977	85
paška ovca	PO216	1,942	1,942	101
paška ovca	PO218	1,943	2,111	85,5
paška ovca	PO219	1,93	1,803	68,5
paška ovca	PO222	1,917	1,957	92
paška ovca	PO223	1,93	1,803	68,5
paška ovca	PO226	1,92	2,048	108
paška ovca	PO227	1,929	1,761	81
paška ovca	PO228	1,913	1,467	66
dalmatinska pramenka	D133	1,885	2	49
dalmatinska pramenka	D134	1,9	2	19
dalmatinska pramenka	D135	1,907	2,103	41
dalmatinska pramenka	D136	1,971	1,816	34,5
dalmatinska pramenka	D137	2	1,455	16
dalmatinska pramenka	D138	1,923	1,63	37,5
dalmatinska pramenka	D139	1,899	1,852	75
dalmatinska pramenka	D140	1,906	1,488	30,5
dalmatinska pramenka	D141	2	1,647	28
dalmatinska pramenka	D142	2,133	1,524	16
dalmatinska pramenka	IMO141	1,706	0,829	14,5
dalmatinska pramenka	IMO154	1,714	0,75	6
dalmatinska pramenka	IMO166	1,889	0,81	8,5
dalmatinska pramenka	IMO38	1,706	1,381	29
dalmatinska pramenka	IMO59	2	0,889	8
dalmatinska pramenka	IMO66	1,889	1	8,5
dalmatinska pramenka	SO118	1,7	0,911	25,5
dalmatinska pramenka	SO123	1,655	0,98	24
dalmatinska pramenka	SO35	1,486	0,839	26
dalmatinska pramenka	SO70	1,524	0,889	16
dalmatinska pramenka	ZO105	1,692	1,128	22
dalmatinska pramenka	ZO122	1,353	0,657	11,5
dalmatinska pramenka	ZO126	1,133	1	17
dalmatinska pramenka	ZO129	1,739	0,889	20
dalmatinska pramenka	ZO34	1,875	1,5	22,5
dalmatinska pramenka	ZO69	1,65	1,138	16,5
dubrovačka ovca	DR121	1,375	0,431	11
dubrovačka ovca	DR130	1,765	0,938	15
dubrovačka ovca	DR138	1,684	0,889	16
dubrovačka ovca	DR139	1,846	1,043	12
dubrovačka ovca	DR146	1,89	2,177	86
dubrovačka ovca	DR147	2	1,027	57
dubrovačka ovca	DR148	1,889	1,7	59,5

Pasmina	Uzorak	A260/A280	A260/A230	Koncentracija (ng/μl)
dubrovačka ovca	DR149	1,91	2,065	64
dubrovačka ovca	DR150	1,886	1,84	74,5
dubrovačka ovca	DR151	1,896	1,549	63,5
dubrovačka ovca	DR152	1,885	1,949	57,5
dubrovačka ovca	DR153	2,037	1,279	27,5
dubrovačka ovca	DR154	1,973	1,327	36,5
dubrovačka ovca	DR155	1,926	1,763	52
dubrovačka ovca	DR156	1,887	1,696	67
dubrovačka ovca	DR157	1,95	1,418	39
dubrovačka ovca	DR158	1,894	1,789	80,5
dubrovačka ovca	DR159	1,908	1,593	72,5
dubrovačka ovca	DR160	1,907	2,05	82
dubrovačka ovca	DR18	1,722	1,069	15,5
dubrovačka ovca	DR23	1,4	0,538	10,5
dubrovačka ovca	DR24	1,636	0,486	9
dubrovačka ovca	DR51	1,591	0,795	17,5
dubrovačka ovca	DR7	1,69	0,583	24,5
dubrovačka ovca	DR77	1,24	0,508	15,5
dubrovačka ovca	DR84	1,179	0,308	16,5
istarska ovca	IO 18	1,633	0,467	24,5
istarska ovca	IO 36	1,867	2,154	14
istarska ovca	IO 42	1,326	0,781	28,5
istarska ovca	IO 44	1,85	1,542	18,5
istarska ovca	IO104	1,769	1,211	11,5
istarska ovca	IO199	1,898	2,154	56
istarska ovca	IO200	1,974	1,5	37,5
istarska ovca	IO201	1,93	1,844	41,5
istarska ovca	IO202	1,923	1,562	50
istarska ovca	IO203	1,917	2,044	46
istarska ovca	IO205	1,925	2	51
istarska ovca	IO206	1,516	0,94	47
istarska ovca	IO207	1,907	1,661	51,5
istarska ovca	IO208	1,922	1,463	49
istarska ovca	IO32	1,824	1,348	15,5
istarska ovca	IO60	1,833	0,786	11
istarska ovca	IO63	1,8	1,2	9
istarska ovca	IO64	1,909	0,913	10,5
istarska ovca	IO65	1,917	1,769	11,5
istarska ovca	IO66	1,794	1,743	30,5
istarska ovca	IO67	1,476	0,534	15,5
istarska ovca	IO68	1,812	1,074	14,5
istarska ovca	IO69	1,769	0,92	11,5
istarska ovca	IO77	1,75	0,933	14
istarska ovca	IO85	1,7	1,133	8,5
muflon	MR24	1,926	1,368	26

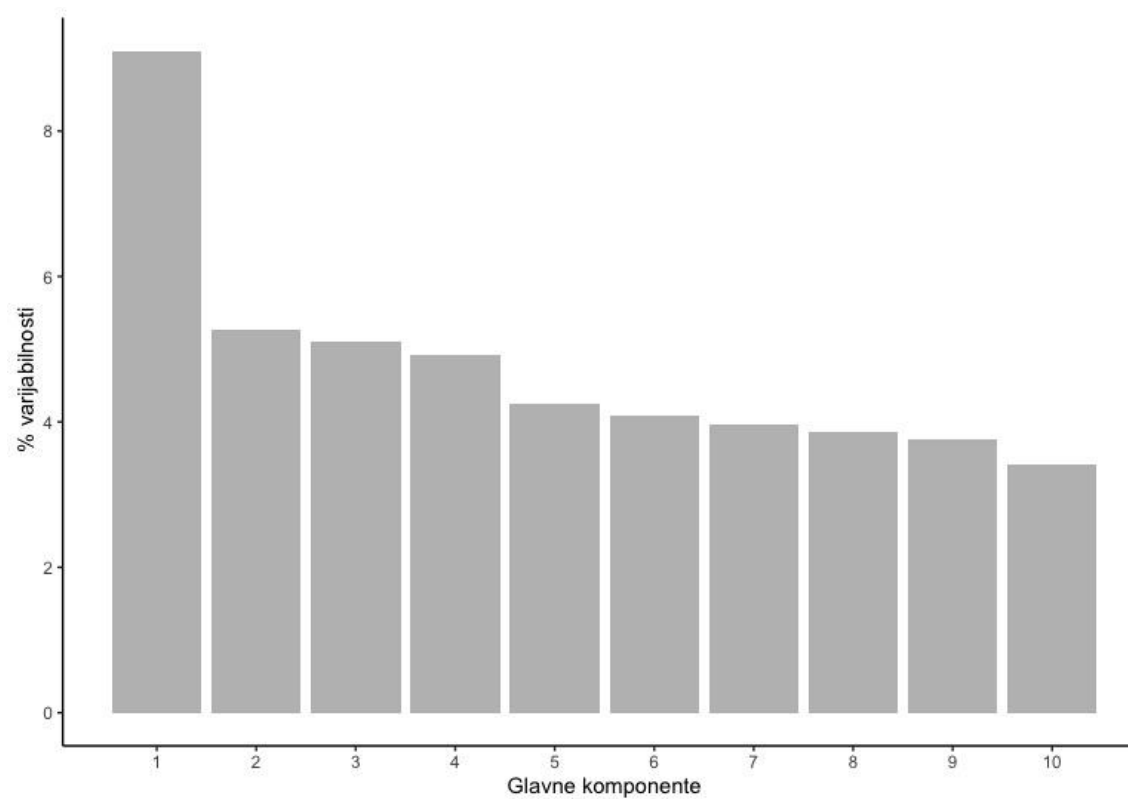
Pasmina	Uzorak	A260/A280	A260/A230	Koncentracija (ng/μl)
muflon	MR25	1,978	1,113	44,5
muflon	MR28	1,963	0,809	53
muflon	MR30	1,826	0,785	42
muflon	MR34	2	0,729	43
muflon	MR40	1,933	1,758	29
muflon	MR43	2	0,96	24
muflon	MR46	1,933	1,234	58
muflon	MR47	2	1,348	31
muflon	MR50	1,962	0,911	25,5
paška ovca	PO19	1	0,429	19,5
paška ovca	PO41	1,5	0,583	10,5
paška ovca	PO45	1,455	0,78	16
paška ovca	PO46	1,333	0,842	16
paška ovca	PO47	1,696	0,907	19,5
paška ovca	PO49	1,457	0,944	25,5
paška ovca	PO61	1,941	1,833	16,5
paška ovca	PO62	2,067	1,409	15,5
paška ovca	PO63	1,947	1,897	37
paška ovca	PO64	1,933	1,813	43,5
paška ovca	PO65	2	1,9	19
paška ovca	PO66	1,931	1,778	56
paška ovca	PO67	1,919	1,919	35,5
paška ovca	PO68	1,915	1,572	136
paška ovca	PO69	1,9	2	38
paška ovca	PO70	1,875	1,705	37,5
paška ovca	PO8	1,778	2,462	16
paška ovca	POG12	1,469	0,809	36
paška ovca	POG14	1,758	1,208	29
paška ovca	POG15	1,875	1,5	7,5
paška ovca	POG17	1,8	2,455	13,5
paška ovca	POG22	1,579	1,034	15
paška ovca	POG24	1,857	1,677	26
paška ovca	POG3	1,783	1,39	41
paška ovca	POG8	1,829	1,786	37,5
north macedonia	SMK 1b	1,731	0,398	22,5
north macedonia	SMK 2b	1,375	0,5	27,5
north macedonia	SMK 3b	2,133	0,464	16
north macedonia	SMK 4b	1,92	0,545	24
north macedonia	SMK 5	2	0,388	13
north macedonia	SMK 6	2,125	0,505	25,5
north macedonia	SMK 7b	2,067	0,492	15,5
north macedonia	SMK 9b	2,067	0,477	15,5

Prilog 4. Kvalitativna provjera DNA agaroznom gel elektroforezom. Dna u količini od 5 μ l aplicirana je na 1% agarozni gel

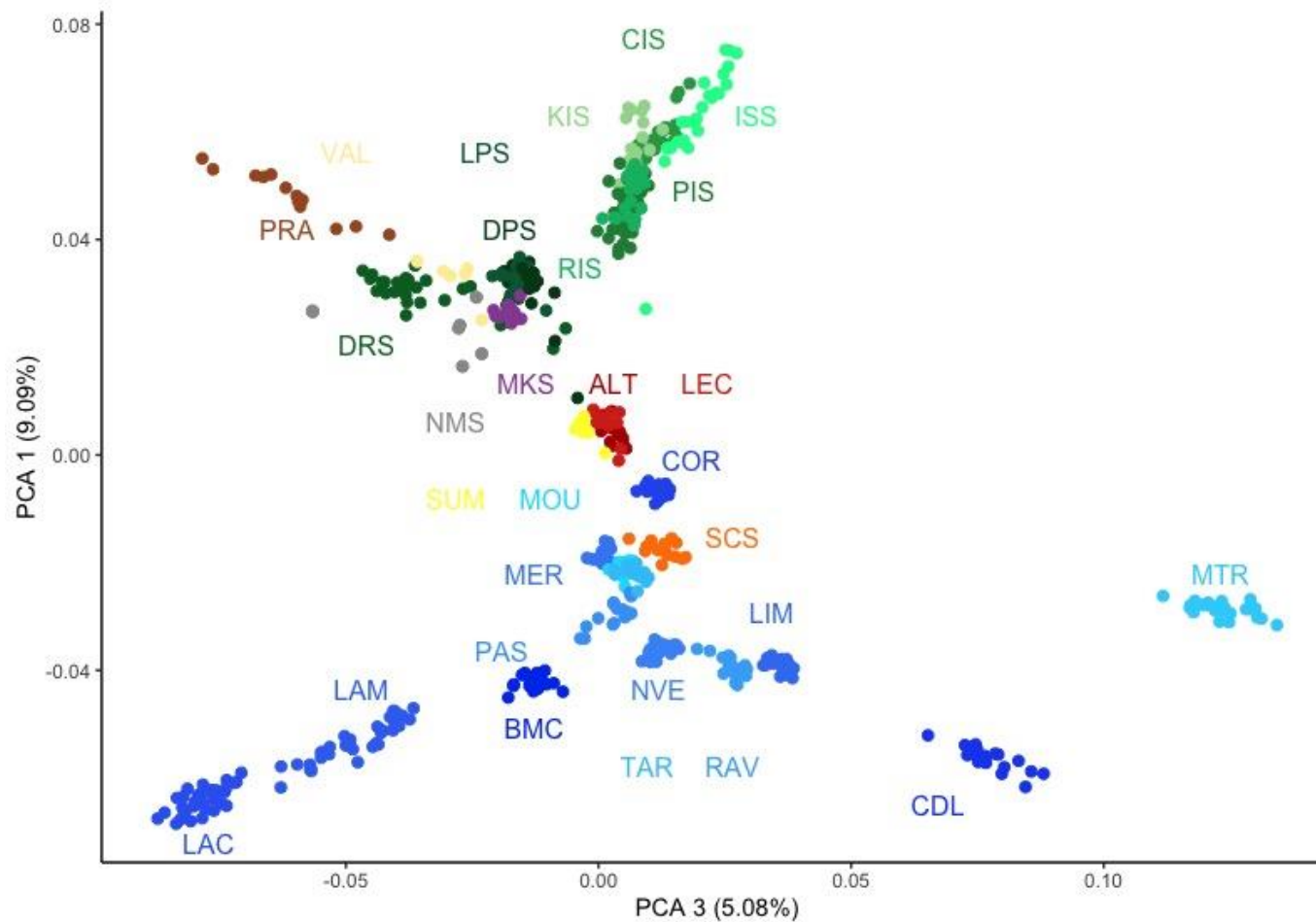




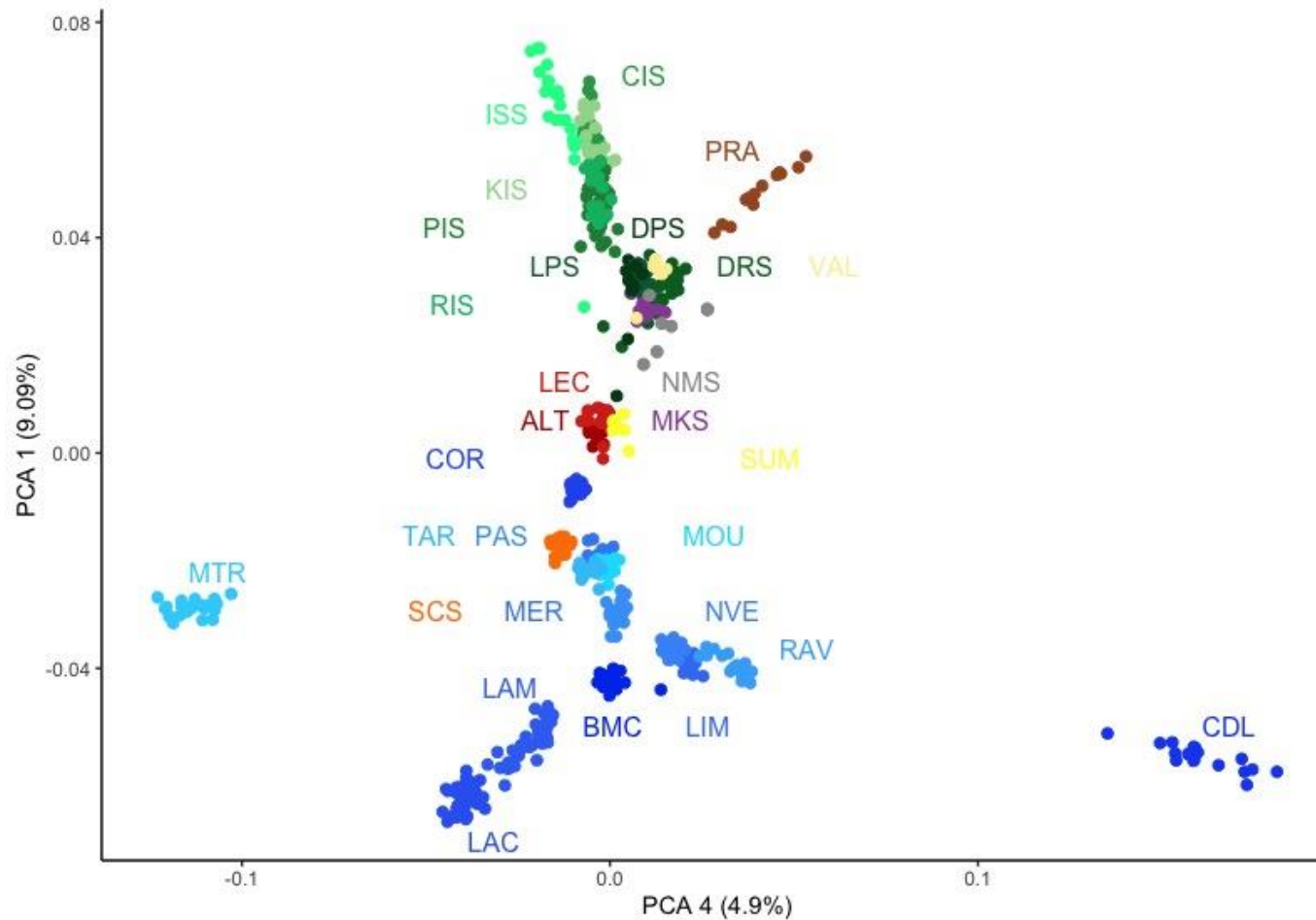
Prilog 5. Postotak objašnjene varijabilnosti (y os) sa prvih deset komponenti (x os) dobivene za evropski set podataka analizom glavnih komponenti (PCA)



Prilog 6. Odnos prve PCA komponente s trećom prikazane za europski set podataka. Države iz kojih pasmine dolaze predstavljene su bojama: Hrvatska – zelena (DRS, LPS, DPS, PIS, KIS, RIS, CIS, ISS), Ukrajina – ljubičasta (MKS), Srbija – smeđa (PRA), Češka – žuta (SUM, VAL), Sjeverna Makedonija – siva (NMS), Italija – crvena (ALT, LEC), Španjolska – narančasta (SCS), Francuska – plava (LAC, LAM, BMC, CDL, NVE, RAV, LIM, MOU, PAS, TAR, COR, MER, MTR). Objašnjenja oznaka pasmina nalazi se u tablici priloga 2.



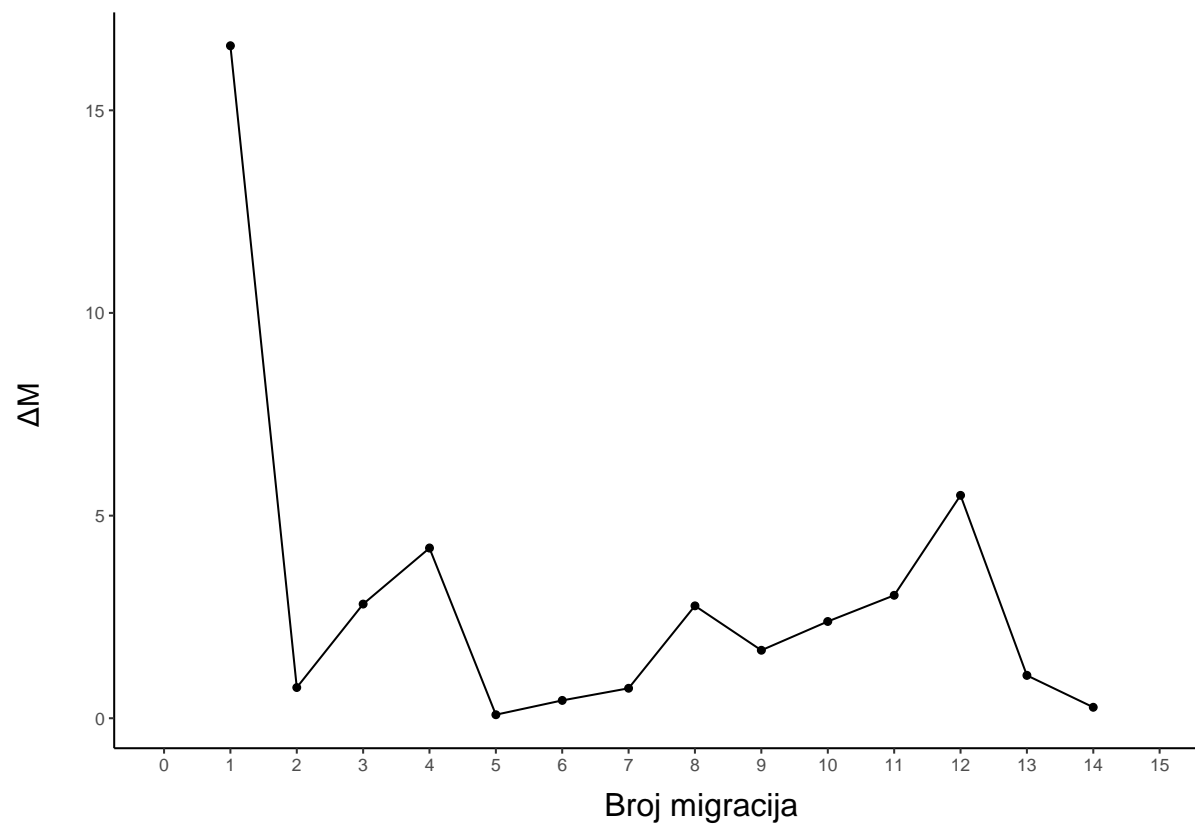
Prilog 7. Odnos prve PCA komponente s četvrtom prikazane za europski set podataka. Države iz kojih pasmine dolaze predstavljene su bojama: Hrvatska – zelena (DRS, LPS, DPS, PIS, KIS, RIS, CIS, ISS), Ukrajina – ljubičasta (MKS), Srbija – smeđa (PRA), Češka – žuta (SUM, VAL), Sjeverna Makedonija – siva (NMS), Italija – crvena (ALT, LEC), Španjolska – narančasta (SCS), Francuska – plava (LAC, LAM, BMC, CDL, NVE, RAV, LIM, MOU, PAS, TAR, COR, MER, MTR). Objašnjenja oznaka pasmina nalazi se u tablici priloga 2.



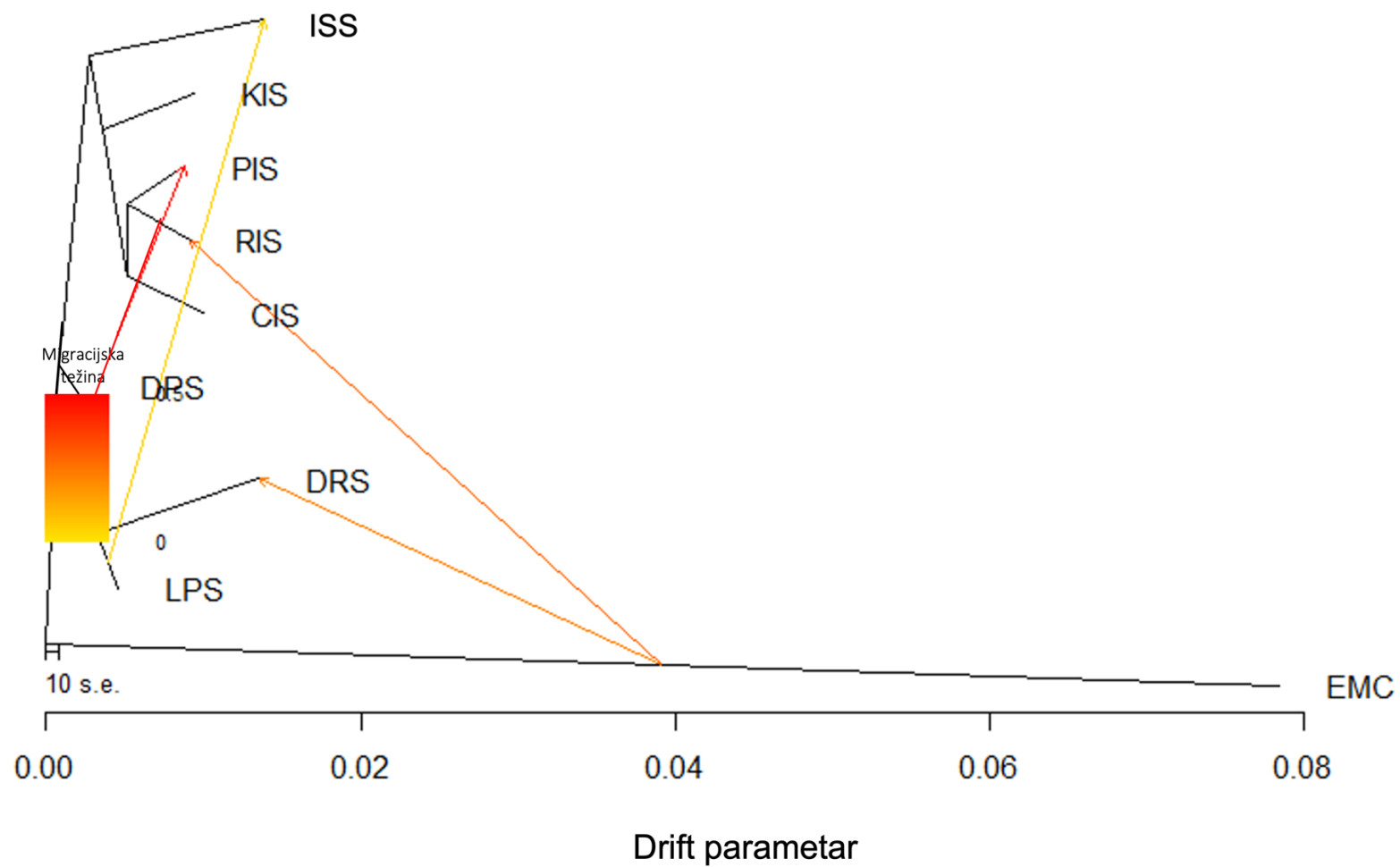
Prilog 8. Grafički prikaz rezultata STRUCTURE analize za europski set. Prikazani su rezultati za K= 3, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 20 i 22. Objašnjenja oznaka pasmina nalazi se u tablici priloga 2.



Prilog 9. Prikaz ΔM vrijednosti utvrđenih na temelju stabla maksimalnih vjerojatnosti hrvatskog set podataka



Prilog 10. Filogenetsko stablo odnosa hrvatskih izvornih pasmina ovaca s četiri migracije konstruirano Treemix softverom. DRS – dubrovačka ovca, ISS – istarska ovca, PIS – paška ovca, RIS – rapska ovca, LPS- lička pramenka, KIS – krčka ovca, CIS – creska ovca, EMC – europski muflon



Prilog 11. Genomski inbriding hrvatskih autohtonih pasmina ovca. Prikazane su prosječne, maksimalne i minimalne vrijednosti inbridinga za svaku za svaku pasminu i ROH kategoriju

Pasmina	$F_{ROH>2Mb}$			$F_{ROH2-4Mb}$			$F_{ROH4-8Mb}$			$F_{ROH8-16Mb}$			$F_{ROH>16Mb}$		
	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max
LPS	0,033	0,000	0,212	0,003	0,000	0,010	0,005	0,000	0,027	0,004	0,000	0,027	0,020	0,000	0,147
CIS	0,049	0,011	0,215	0,008	0,002	0,014	0,008	0,001	0,017	0,011	0,000	0,049	0,020	0,000	0,158
DPS	0,025	0,000	0,169	0,002	0,000	0,007	0,004	0,000	0,021	0,006	0,000	0,057	0,011	0,000	0,135
DRS	0,070	0,002	0,257	0,007	0,001	0,018	0,011	0,000	0,033	0,018	0,000	0,054	0,033	0,000	0,182
ISS	0,053	0,010	0,278	0,010	0,004	0,018	0,013	0,002	0,027	0,013	0,000	0,034	0,016	0,000	0,208
KIS	0,058	0,000	0,176	0,007	0,000	0,015	0,007	0,000	0,020	0,013	0,000	0,052	0,029	0,000	0,121
PIS	0,035	0,000	0,236	0,005	0,000	0,017	0,005	0,000	0,024	0,009	0,000	0,052	0,014	0,000	0,158
RIS	0,055	0,006	0,367	0,005	0,000	0,012	0,009	0,000	0,030	0,014	0,000	0,049	0,026	0,000	0,278