

# Genomska introgresija u hrvatskim pasminama goveda

---

Mijadžiković, Zvonimir

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:204:641138>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**GENOMSKA INTROGRESIJA U HRVATSKIM  
PASMINAMA GOVEDA**  
DIPLOMSKI RAD

Zvonimir Mijadžiković

Zagreb, srpanj, 2024.  
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Genetika i oplemenjivanje životinja

**GENOMSKA INTROGRESIJA U HRVATSKIM  
PASMINAMA GOVEDA**

DIPLOMSKI RAD

Zvonimir Mijadžiković

Mentor:

Prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik

Zagreb, srpanj, 2022.  
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA**  
**O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Zvonimir Mijadžiković**, JMBAG 0178122352, rođen/a 04.01.2001. u Pakracu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**GENOMSKA INTROGRESIJA U HRVATSKIM PASMINAMA GOVEDA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

*Potpis studenta / studentice*

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Zvonimir Mijadžiković**, JMBAG 0178122352, naslova

**GENOMSKA INTROGRESIJA U HRVATSKIM PASMINAMA  
GOVEDA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof.dr.sc Vlatka Čubrić Čurik mentor

\_\_\_\_\_

2. Prof. dr. sc. dr. h. c. Ino Čurik član

\_\_\_\_\_

3. Doc. dr. sc. Vladimir Brajković član

\_\_\_\_\_

# Zahvala

Zahvaljujem se:

Prof. dr. sc. Vlatki Čubrić Čurik, hvala vam što ste mi pružili priliku da s vama radim ovaj rad. Hvala vam na svome vremenu, stručnome vodstvu, povjerenju, strpljenu, savjetima i sugestijama tijekom izrade ovoga rada, i tijekom cijeloga diplomskoga studija.

Prof. dr. sc. Ini Čuriku, na vrlo vrijednom savjetima i pristupačnosti i volji da se određene stvari objasne, hvala vam na svim kritikama koje su me naučile da uvijek može bolje i da ne budem zadovoljan da osrednjim stvarima.

Doc.dr.sc. Vladimiru Brajkoviću na svom utrošenom vremenu na nas studente. Hvala vam na svim savjetima, svim pojašnjenima, hvala vam na tome što ste se uvijek trudili oko nas i gurali nas da budemo najbolja verzija sebe.

Dr.sc. Ivani Držaić na svim skriptama, pristupačnosti i izdvojenom vremenu koje je bilo potrebno za vizualizaciju ovoga rada.

Hvala svim prijateljima koji su mi uljepšali i obogatili moje studentske dane. Hvala kolegama Luciji Matijević, Ivi Šefček, Bartolu Smutnom, Hegvidi Pražić i Nikoli Liniću što su mi ovih par godina učinili jednim od najljepših godina mog života. Hvala ti Lucija na pomoći oko vizualizacije slika. Hvala vam Iva i Hedviga na svim razgovorima koje smo imali. Hvala Bartol i Nikola na svakoj kavi na Črkasu i svakoj temi, koliko god ona luda bila. Hvala ti Sale što se na tebe čovjek uvijek može osloniti i hvala ti na svakom događaju kojega smo prošli. Na kraju hvala mojim roditeljima, Goranu i Lahorki, na strpljenu i povjerenju tijekom studiranja, hvala vam na svojoj brizi. Hvala ti Gabi jer si najbolja sestra na svijetu. Hvala svoj rodbini na podršci.

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Ciljevi rada.....	3
3. Pregled literature .....	4
<b>3.1. Genomika i SNP-ovi .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2. Genetska varijabilnost i introgresija .....</b>	<b>6</b>
<b>3.3. Hrvatske pasmine goveda .....</b>	<b>8</b>
3.3.1 Buša .....	8
3.3.2 Istarsko govedo.....	10
3.3.3 Slavonsko-srijemski podolac .....	12
<b>3.4. Migracije goveda .....</b>	<b>14</b>
4. Materijali i metode.....	16
<b>4.1. Izrada seta podataka .....</b>	<b>16</b>
<b>4.2. Analiza genomske raznolikosti .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3. Procjene sličnosti populacija .....</b>	<b>18</b>
<b>4.4. Efektivna veličina populacije .....</b>	<b>19</b>
<b>4.5. Analize migracije gena.....</b>	<b>20</b>
5. Rezultati i rasprava.....	21
<b>5.1. Parametri genetske raznolikosti .....</b>	<b>21</b>
<b>5.2. Efektivna veličina populacije .....</b>	<b>23</b>
<b>5.3 Koeficijenti inbreedinga.....</b>	<b>27</b>
<b>5.4 Procjene sličnosti populacija .....</b>	<b>29</b>
5.4.1 FST između populacija .....	29
5.4.2 PCA.....	32
5.4.3 POPVAE .....	34
5.4.4 Neighbor-net mreža .....	36
<b>5.5. Struktura populacije.....</b>	<b>39</b>
<b>5.6. Migracije gena.....</b>	<b>42</b>
6. Rasprava .....	44
7. Zaključak .....	46
8. Literatura.....	48

## Sažetak

Završnog rada studenta/ice Zvonimir Mijadžiković, naslova

### **GENOMSKA INTROGRESIJA U HRVATSKIM PASMINAMA GOVEDA**

Hrvatske pasmine goveda imaju dugu povijest u poljoprivredi Hrvatske. Danas nisu toliko zastupljene u proizvodnji zbog uvezenih komercijalnih pasmina. Međutim, hrvatske pasmine goveda posjeduju gene za otpornost koji su rezultat lokanih adaptacija, što opravdava potrebu za njihovom konzervacijom. Pasmine su se razvijale i prilagođavale različitim geografskim područjima Republike Hrvatske, čime svojim izgledom i prilagodljivošću odražavaju te uvjete. U ovom istraživanju korišten je Illumina Bovine HD BeadChip (777 K) te ukupno 674 goveda raspodijeljena u 25 pasmina. Ključne informacije koje SNP-ovi sadrže korištene su u daljnjim analizama genetske raznolikosti i strukture populacija. Cilj rada bio je identificirati genetsku introgresiju unutar hrvatskih pasmina. Uočeno je izdvajanje slavonsko-srijemskog podolca kao zasebne pasmine već u samim počecima analiza. Buša i istarsko govedo često su se grupirali zajedno tijekom analiza glavnih komponenti i neighbor-net mreža. Analize strukture populacija ukazuju na visoke razine primjese (engl. admixture) unutar pasmine buše, dok su nešto manje razine zabilježene unutar istarskog goveda. Slavonsko-srijemski podolac u analizama strukture populacije ponovno se izdvaja od svih ostalih pasmina korištenih u analizi. Analize migracije gena nisu prikazale protoke gena između hrvatskih i lokalnih pasmina, poput talijanskih i komercijalnih. Rezultati ovog rada pokazuju genetsku različitost hrvatskih pasmina goveda u odnosu na ostale pasmine te potvrđuju njihov neupitan status. Za precizniju i pouzdaniju analizu potrebno je povećati uzorak i uključiti dodatne metode identifikacije introgresije.

Ključne riječi: hrvatske pasmine goveda, SNP, introgresija, genetska varijabilnost



## Summary

Of the final work – student Zvonimir Mijadžiković, entitled

### **GENOMIC INTROGRESSION IN CROATIAN CATTLE BREEDS**

Croatian cattle breeds are deeply rooted in the agricultural history of Croatia. Today, they are not involved in production due to the introduction of imported commercial breeds. However, Croatian cattle breeds possess resistance genes that are the result of local adaptations, which justifies the need for their conservation. These breeds have developed and adapted to various geographical regions of the Republic of Croatia, reflecting those conditions in their appearance and adaptability. In this research, the Illumina Bovine HD BeadChip (777 K) was used, and a total of 674 cattle were divided into 25 breeds. The key information contained in these SNPs was used in further analyses of genetic diversity and population structure. The aim of the study was to identify the genetic introgression within Croatian cattle breeds. The Slavonian-Syrmian Podolian was identified as a separate breed early in the analysis. Buša and the Istrian cattle frequently grouped together in principal component analyses and neighbor-net networks. Population structure analyses indicate high levels of admixture within the Buša breed, while somewhat lower levels were observed within the Istrian cattle. The Slavonian-Syrmian Podolian again stood out as distinct from all other breeds in the structure analyses. Analyses of gene migration did not show gene flows between Croatian and local breeds, like Italian and commercial breeds. The results of this study highlight the genetic distinctiveness of Croatian cattle breeds compared to other breeds, confirming their unquestionable status. For more precise and reliable analysis, it is necessary to increase the sample size and include additional methods for identifying introgression.

Keywords: Croatian cattle breeds, SNP, introgression, genetic variability

# 1.Uvod

Procesi pripitomljavanja i migracija goveda usko su vezani uz ljude migracije. Kretanje ljudi diljem Europe i promjena načina života iz nomadskoga u sjedilački imalo je značajan utjecaj na migracijske putanje goveda kroz Europu (Zeder 2008., Clutton-Brock 1996.). Moderno govedo se kroz tisuće godina adaptacije i evolucije podijelilo na dvije vrste, *Bos taurus* i *Bos taurus indicus*. Jedna je teorija da su se prva taurina goveda pripitomila prije 10 000 godina na području plodnog polumjeseca (Orozco-terWengel i sur. 2015.), dok se za mjesto domestikacije indijskoga goveda smatra dolina Inda prije 2000 godina (Troy i sur. 2001). Međutim Stock i Gifford-Gonzalez (2013.) u svome radu opisuju teoriju o još jednome mjestu domestikacije goveda, a to je sjever Afrike. Nakon ekspanzije poljoprivrede, taurino govedo koloniziralo je Europu, Aziju i Afriku i dospjelo u južnu Europu prije 8.000 godina (Zeder 2008.). Trenutna geografska distribucija podrijetla euroazijskih pasmina goveda odražava te migracijske putove, s taurinim govedima koja naseljavaju Europu i sjevernu Aziju, odnosno indijskim u južnoj Aziji (Upadhyay i sur. 2017, Sermyagin i sur. 2018.). Analize cijelog genoma pružile su dokaze da nekoliko južnoeuropskih pasmina ima podrijetlo iz afričkih taurinih goveda i indijskih goveda (Decker i sur. 2014.). Na prvim istraživanjima koja su se bavila s populacijskom strukturom i filogenetskim odnosima između taurinih i indijskih pasmina goveda, temeljila su se na alozimima, sekvencama mitohondrijske DNA i mikrosatelitima (Kantanen i sur. 2000.).

Razvoj tehnologije i novih načina analiza dovodi do upotrebe SNP-ova kao izrazito bitnih izvora informacija i varijabilnosti za diferencijaciju pasmina goveda. Također ekstrakcija DNA iz arheoloških uzoraka kostiju *Bos taurus primigenius* može služiti kao izvor informacije kada se koristi u svrhu istraživanja genetske introgresije i protoka gena.

Područje balkanskoga poluotoka ima bogatu povijest te se često nalazilo na migracionim putanjama raznih naroda. Područje je bilo pod nadzorom mnoštva carstava, bilo to rimsko, tursko ili slično. Narodi koji su obitavali na području sa sobom su dovodili i svoje životinje. Miješanjem tih životinja s lokalnima dovelo je do stvaranja novih tipova koje su se onda adaptirale na područje. Introgresija koja se tada dešava u lokalnim pasminama povećava genetsku varijabilnost, donosi nove gene kao što su geni otpornosti na visoke temperature.

Danas se mehanizmi introgresije često koriste u svrhu oplemenjivanja i unaprijeđenja proizvodnih svojstava pasmina. Proučavanje promjene genetske varijabilnosti i mehanizama introgresije unutar pasmina zbog modernih metoda selekcije i križanja postaje sve važnije. Preučestalim pretapajućim križanjima pasmina, one gube visoko vrijednu varijabilnost i

adaptacija koju je pasmina stekla obitavajući i razvijajući se na njenom području. Proces introgresije u hrvatskim autohtonim pasminama goveda je dosta neistraženo područje. U ovome se radu proučavaju SNP-ovi triju autohtonih pasmina goveda iz Republike Hrvatske i to buša, istarsko govedo i slavonsko-srijemski podolac. Kako bi se usporedile hrvatske pasmine, u ovome radu su korištene komercijalne europske pasmine, pasmine koje su geografski blizu hrvatskima te afričke i indijske pasmine, čiji su SNP-ovi preuzeti iz javno dostupnih izvora. Koristeći informacije dobivene iz SNP čipa velike gustoće na razini cijeloga genoma, proveden je niz analiza kojima su se utvrdili genetski parametri populacija, inbriding unutar populacija, razine introgresije između pasmina goveda.

## 2. Ciljevi rada

Do sada se procjena razine introgresije hrvatskih autohtonih pasmina goveda temeljila na analizi mikrosatelita, SNP čip genotipova ili nekodirajuće kontrolne regije mtDNA (D-loop). SNP čip velike gustoće do sada nije bio korišten u analizama genetske introgresije i rezultati nisu bio uspoređeni s ostalim svjetskim pasminama..

Ciljevi ovog rada su:

- Analiza genetskih parametara hrvatskih pasmina goveda
- Prostore analize udaljenosti između hrvatskih pasmina goveda i svjetskih pasmina
- Analiza genetske introgresije i primjese pasmina sa hrvatskim pasminama
- Vizualizacija gore navedenih analiza

### 3.Pregled literature

#### 3.1. Genomika i SNP-ovi

Molekularna genetika i genomika revolucionarno su djelovali na poljoprivrednu znanost, nudeći dosad neviđene uvide u genetsku osnovu svojstava usjeva i stoke. Te tehnologije omogućuju identifikaciju i manipulaciju gena odgovornih za poželjna svojstva kao što su otpornost na bolesti, prinos i tolerancija na stres. Poljoprivredne znanosti suočavaju se s brojnim izazovima, uključujući potrebu da se prehrani rastuća globalna populacija, klimatske promjene i potražnja za održivom poljoprivrednom praksom. Molekularna genetika i genomika pružaju moćne alate za rješavanje ovih izazova poboljšavajući naše razumijevanje genetskih mehanizama koji leže u osnovi važnih svojstava. Napredak u tehnologijama sekvenciranja DNA, posebice sekvenciranja sljedeće generacije (NGS), transformirao je genetska istraživanja. NGS omogućuje brzo i isplativo sekvenciranje cijelih genoma, omogućujući sveobuhvatne studije genetske varijacije i funkcije gena. Tehnologije genotipizacije identificiraju genetske varijacije, kao što su polimorfizmi jednog nukleotida (SNP), koji su povezani s određenim osobinama. Visokoučinkovite platforme za genotipizaciju omogućuju velike genetske studije i razvoj genetskih markera za programe uzgoja. SNP čipovi omogućuju istovremenu analizu tisuća SNP-ova, što ih čini neprocjenjivim za studije asocijacija na cijelom genomu (GWAS) i selekciju potpomognutu markerima (MAS) u poljoprivredi. Ti su čipovi razvijeni za razne vrste domesticiranih životinja, olakšavajući identifikaciju genetskih varijanti povezanih s osobinama (Rafalski 2002.).



Slika 3-1. Prikaz SNP čip-a

izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Picture-of-an-Illumina-SNP-single-nucleotide-polymorphism-chip-25-x-8-cm-left-each\\_fig1\\_265382219](https://www.researchgate.net/figure/Picture-of-an-Illumina-SNP-single-nucleotide-polymorphism-chip-25-x-8-cm-left-each_fig1_265382219) – pristup 14.04.2024

Genomski podatci dobivaju se putem takozvanih SNP čipova. Oni se međusobno mogu razlikovati po količini SNP-ova koje mogu prepoznati pa zato imamo SNP čipove male, srednje i velike gustoće. Gustoća ponajviše ovisi o čipu a i samoj potrebi za genomskom informacijom, tako da postoje SNP čipovi koji mogu prikazati samo par tisuća SNP-ova, a neki od čipova velike gustoće mogu nekoliko stotina tisuća. Polimorfizmi jednog nukleotida (SNP) najčešći su tip genetske varijacije u životinjskom genomu. SNP-ovi se pojavljuju otprilike jednom svakih 100 do 300 parova baza u genomu, što ih čini neprocjenjivim alatima za genetska istraživanja. Ove promjene pojedinačnih parova baza igraju ključnu ulogu u genetskoj raznolikosti i vrijedni su markeri za proučavanje genetskih povezanosti sa svojstvima, otpornošću na bolesti i evolucijskom biologijom. SNP-ovi nastaju iz točkastih mutacija, koje uključuju supstituciju, umetanje ili brisanje jednog para nukleotida u sekvenci DNA. Postoje razni mehanizmi zbog kojih dolazi do nastanka polimorfizma jednog nukleotida. Spontane mutacije prirodno se javljaju tijekom replikacije DNA. Pogreške u aktivnosti DNA polimeraze ili spontane kemijske promjene u nukleotidima mogu dovesti do ugradnje netočnih baza, što rezultira SNP-ovima (Kunkel i Bebenek 2000.). Također jedan od mehanizama nastanka SNP-a može biti rekombinacija. Genetska rekombinacija tijekom mejoze može stvoriti SNP-ove kroz razmjenu genetskog materijala između homolognih kromosoma. Polimorfizmi jednog gena imaju razne primjene u području animalne proizvodnje, dobrobiti, populacijskoj i konverzacijskoj genetici. Kod mliječnih goveda, SNP-ovi su korišteni za identifikaciju QTL-ova povezanih s prinosom mlijeka, sadržajem masti i proteina. GWAS i SNP genotipizacija odredila je specifične gene, kao što su DGAT1 i ABCG2, koji utječu na svojstva proizvodnje mlijeka (Grisart i sur. 2002., Lehnert i sur. 2015., Naserkheil i sur. 2019.).

SNP-ovi su također vrijedni za identificiranje genetskih varijanti povezanih s otpornošću na bolesti. Korišteni su u istraživanjima bolesti papaka i kliničkog mastitisa (Naderi i sur. 2018.), respiratornih bolesti goveda (Neupane i sur. 2018.). Uporaba SNP-ova nam može služiti kako bi se unaprijedio menadžment reprodukcije i selekcije na samoj farmi jer nam omogućava otkrivanje jedinki nositelja štetnih recesivnih alela, koje se potom mogu izlučiti iz populacije (Biscarini i sur. 2016.). Oni se često koriste i vrlo su bitni u istraživanjima kojima se bave populacijska i konzervacija genetika. Daju nam uvid o genetskoj varijabilnosti unutar i između populacija, strukturi i povijest samih. Informacija koje nam pružaju SNP-ovi omogućavaju nam uvid u genetsku raznolikost populacije što nam je od velike pomoći kada

govorimo o konzervaciji ugroženih vrsta i pasmina. Parametri poput efektivne veličine populacije, homozigotnosti u populaciji i sl., informiraju nas o ugroženosti promatranih vrsta i prijevremeno nas upozoravaju o propadanju iste.

### 3.2. Genetska varijabilnost i introgresija

Genetska varijabilnost temelj je uzgojnih programa i prilagodbe goveda, bitna za poboljšanje produktivnosti, otpornosti na bolesti i prilagodljivosti promjenjivim okruženjima. Genetska varijabilnost odnosi se na varijacije u sekvencama DNA među pojedincima unutar populacije. Ključne su za opstanak i prilagodljivost vrsta, pružajući temelj za prirodnu i umjetnu selekciju. Genetska varijabilnost ključna je za uspjeh uzgojnih programa usmjerenih na poboljšanje poželjnih osobina kao što su proizvodnja mlijeka, stope rasta i otpornost na bolesti. Varijabilnost se može pojaviti kao posljedica mutacija, rekombinacija ili prijenosa gena između populacija migracijom i križanjem, unošenjem novog genetskog materijala. Postoje mnoge mjere kojima se utvrđuju razine genetske varijabilnosti, mjere poput heterozigotnosti, alelnog bogatstva i genetske udaljenosti. Svi ti parametri nam pružaju ključne informacije o varijabilnosti i stanju unutar i između populacija. One su nam ključne za uspjeh uzgojnih programa usmjerenih na poboljšanje poželjnih svojstava kao što su proizvodnja mlijeka, stope rasta i otpornost na bolesti. Također se mogu koristiti u svrhe adaptacija pasmina pa je i dokazano da su pasmine goveda s većom genetskom raznolikošću pokazale bolju prilagodljivost toplinskom stresu (Freitas i sur. 2021.), sušnim uvjetima (Bhardwaj i sur. 2021.) i okruženjima na velikoj nadmorskoj visini. Održavanje genetske varijabilnosti ključno je za očuvanje pasmina goveda, osiguravajući njihov dugoročni opstanak i prilagodljivost (Barker 2011.).

Genomska introgresija odnosi se na proces prenošenja gena iz jedne populacije u drugu kroz hibridizaciju i povratno križanje. Kod goveda ovaj proces ima mnoštvo implikacija na biološku raznolikost, poboljšanje pasmine i upravljanje genetskim resursima. Sam proces može nastati prirodnim i umjetnim putem, gdje se pod umjetnim misli na ljudski utjecaj. Povijesno gledano do introgresije je najčešće dolazilo zbog hibridizacije pasmina koje su se u tome trenutku nalazile na istome području. Primjer tome bi bila hibridizacija *Bos primigenius* s domaćim pasminama *Bos taurus*, što je ujedno i dovelo do introgresije gena *Bos primigenius* u populacije pasmina domaćih goveda (Park i sur. 2015., Bradley i sur. 1998.). Introgresija

pomaže u održavanju i poboljšanju genetske raznolikosti unutar populacije goveda, što je ključno za prilagodljivost promjenjivim okruženjima i bolestima. Kao primjer umjetne introgresije mogao bi se uzeti bilo koji ljudski poduhvat kojemu je cilj unaprijediti proizvoljna svojstva goveda. Pa se u tu svrhu introgresija koristila kako bi se poboljšala svojstva poput mliječnosti, mesnatosti i svojstva kvalitete mesa, reprodukcije te konverzije hrane. Međutim proces ne mora stati samo na karakteristikama proizvodnje pa se tako mehanizmi introgresije mogu koristiti kako bi se poboljšala adaptabilnost pasmina. Primjer tome je često križanje visoko produktivnih pasmina s primitivnim pasminama kako bi im se poboljšala otpornost na parazite, bolesti, visoke temperature (Shannon i sur. 2023., Hernández-Rivera i sur. 2019.), otpornost na sušu i sl. (Bessong 2016.). Međutim sam proces može imati i neke mane. Neplansko sparivanje pasmina koje nisu kompatibilne može narušiti genetsku varijabilnost pasmine koju se želi unaprijediti (Adavoudi i Pilot 2021.). Često dolazi do toga da se procesom križanja izgube adaptabilna svojstva pasmina koje su one dobile prilagođavajući se na svoje okolišne uvijete. Uz to loša provedba hibridizacije može dovesti do smanjenja proizvodnih i reprodukcijских svojstava, većeg broja mrtvorodenih potomaka. Kako bi se ostvarili pozitivni rezultati genomske introgresije treba osigurati dobar uzgojno-seleksijski program, koji će onemogućiti pojavi negativnih posljedica samog procesa.



### 3.3. Hrvatske pasmine goveda

#### 3.3.1 Buša

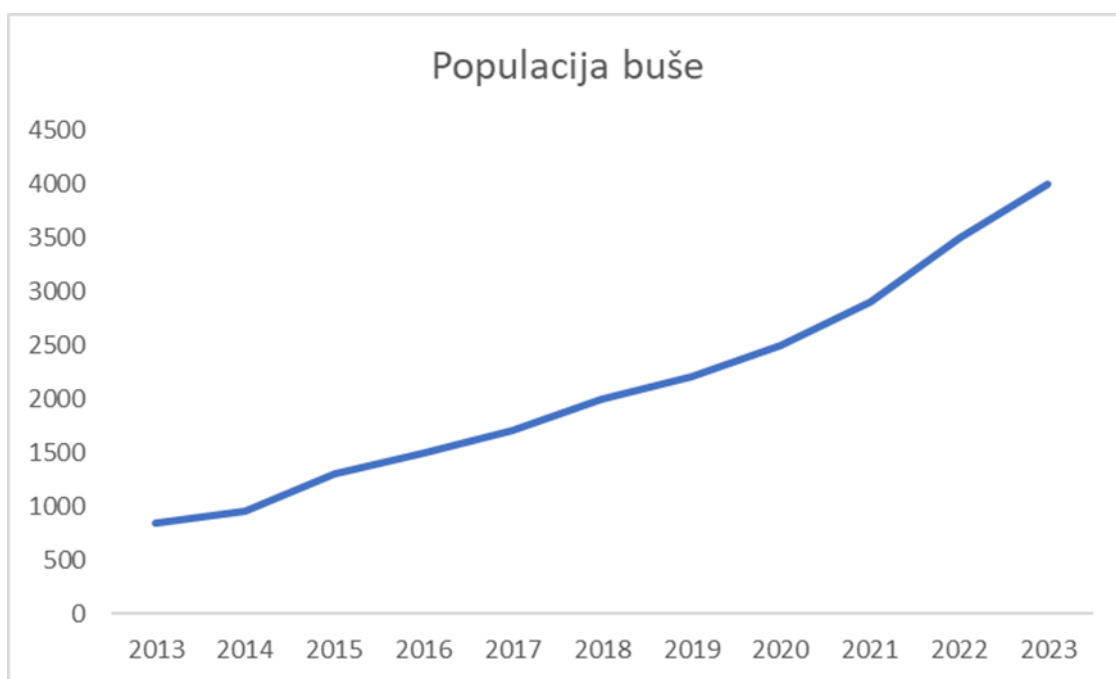
Buša je jedna od naših autohtonih pasmina goveda. Kao i ostale pasmine svojim eksterijerom, kondicijom i konstitucijom te proizvodnjom savršeno opisuje područje u kojemu obitava. Ona je skromno govedo brachicernog tipa, koja se adaptirala na krški reljef u kojemu se i sama uzgaja. Njen manji tjelesni okvir joj omogućuje pristup vegetaciji koja raste među vapnenačkim stijenama. Bušu često opisuju kao maleno, čvrsto, otporno, zbijeno govedo čvrstih nogu i papaka. U prosjeku visina grebana buše iznosi 114 cm, dužina trupa 136 cm, obujam prsa 162 cm, dubina prsa 61 cm (Konjačić i sur. 2004.). Glava joj je uska i duguljasta. Vrat je srednje dug, trup je kratak, a rep tanak i seže do skočnoga zgloba. Buša je najčešće jednobojna a može biti bijele, crvene, smeđe i crne boje. Rjeđe se pojavljuju prugaste buše.



Slika 3-3. Buša na pašnjaku

izvor: <https://www.boskinac.com/blog/en/busa-an-indigenous-cattle-breed-served-as-a-delicacy-at-the-boskinac-restaurant/> - pristup 16.04.2024.

Ona kao pasmina ne postoji samo na području Republike Hrvatske, nego je proširena i u susjedne zemlje. U jednome trenutku potkraj 20.st. buša je bila na rubu opstanka te je bilo potrebno provesti program zaštite i revitalizacije. Populacija danas ima trend porasta, kao što je vidljivo u grafu 3-1., međutim buša je i dalje svrstana kao ranjiva pasmina.



Graf 3-1. Veličina populacije istarskoga goveda u zadnjih 10 godina.

Izvor: FAO, 2024

### 3.3.2 Istarsko govedo

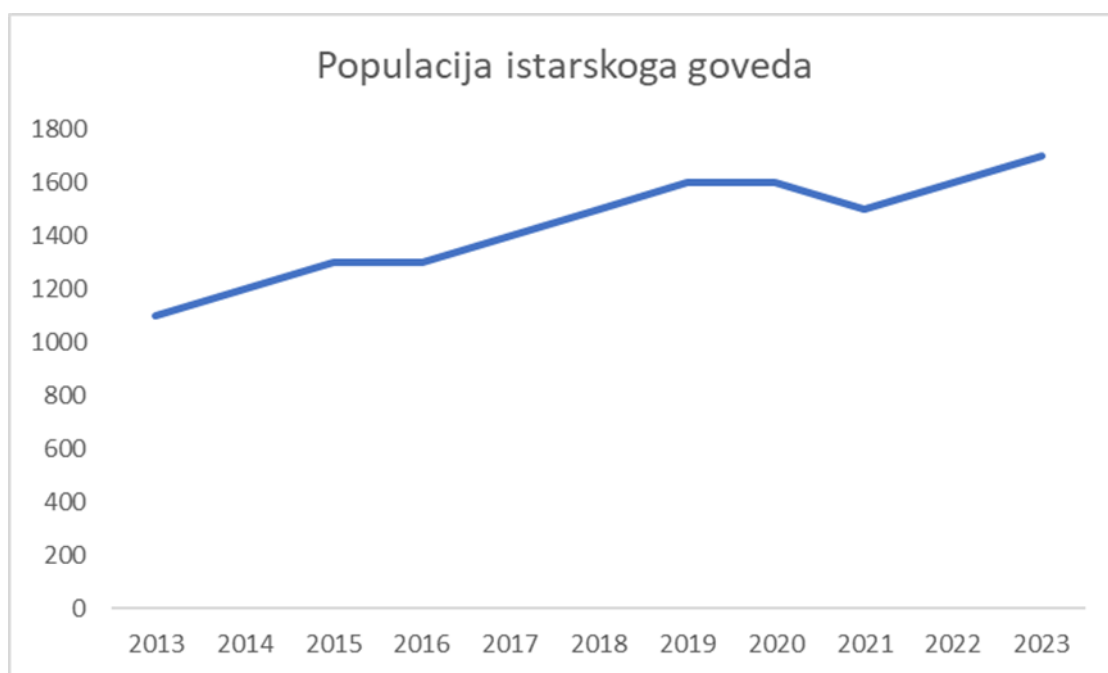
Istarsko govedo ili lokalno poznat kao boškarin jedan je od predstavnika istarske kulture. Uvriježen je uz samu kulturu i živote ljudi u toj županiji. Pripada u primitivne pasmine, kao i ostale hrvatske pasmine goveda, što joj se ne uzima za manu budući sama pasmina može poslužiti u brojnim križanjima kojima će se mijenjati genetska varijabilnost. Tradicionalno se uzgaja na području Istarske županije i okolnim otocima. Tijekom davnina se istarsko govedo koristilo kao radno govedo uz to što je davalo meso i mlijeko. Istarsko govedo vanjštinom nalikuje na podolska goveda, što bi dalo naslutiti na povijesnu prisutnost *Bos primigenius-a*. U povijesnim zapisima se često spominju križanja s talijanskim pasminama poput romangole i maremmane u svrhu introgresije. Boškarin je kasnozrelo i dugovječno govedo. U grebenu je visoko 138 cm, trup je dugačak oko 162 cm, obujam prsa iznosi 196 cm, a dubina 74 cm. Glava je srednje duga, a krase ju prepoznatljivi rogovi u obliku lire koji mogu biti dugački 45 cm (Ivanković i sur. 2006.). Pasmına je to grube radne konstitucije, što se na njoj i vidi. Goveda imaju razvijeniju prednju polovicu, snažne noge i pravilne papke. Ženke mogu dostići kilažu od 650 kg, dok mužjaci mogu težiti između 700 i 800 kg (Ivanković i sur. 2006.). Najčešća boja je bijela i nijansa svijetlosive, dok se kod mužjaka često pojavljuju tamnije pigmentacije.



### Slika 3-4. Mužjak istarskog goveda

izvor: <https://banka-gena.mps.hr/hrvatske-izvorne-i-ugrozene-pasmine/istarsko-govedo/> -  
pristup 16.04.2024.

Populacija istarskoga goveda ima pozitivan trend u zadnjih par godina što se da uočiti u grafu 3-2, međutim istarsko govedo se i dalje smatra ranjivom pasminom. Zahvaljujući raznim udrugama koje promoviraju pasmine i dobro osmišljenim uzgojno-seleksijskom programima danas se istarsko govedo smatra cijenjenom pasminom.



Graf 3-2. Veličina populacije istarskoga goveda u zadnjih 10 godina.

Izvor: FAO, 2024

### 3.3.3 Slavonsko-srijemski podolac

Slavonsko-srijemski podolac pripada u skupinu dugorožnih goveda i predstavlja udomaćeni oblik izvornog oblika goveda *Bos primigenius*. Pasma se originalno koristila za tešku vuču po šumama u područjima Slavonije, Baranje te Srijema. Osim koristi za rad također je bila bitna zbog proizvodnje mesa. Dolaskom industrijalizacije lagano se počeo smanjivati broj podolaca te su njihovu ulogu radnih životinja preuzeli teški hladnokrvni konji. Slavonsko-srijemski podolac je čvrsto i jako govedo grube konstitucije. Visina u grebenu mu je u prosjeku 127 cm, dugo je 152 cm, dubina prsa iznosi 68 cm, a obujam 187 cm. Glava je duga i široka s rogovima dužine 46 cm (Brinzej i Rastija 1974.). Budući je pasmina koja ima radne predispozicije, prednji dijelovi trupa su joj razvijeniji od ostatka tijela. Tjelesna težina krava iznosi između 400 i 550 kg, a bikova između 550 i 700 kg (Brinzej i Rastija 1974.). Boja im je sivobijela do tamnosiva. Često su područja oko vrata, glave i plahtice tamnije pigmentacije (Caput i sur 2010.).



Slika 3-5: Slavonsko-srijemski podolac na pašnjaku

Izvor: <https://pp-lonjsko-polje.hr/programi/uzgojni-program-za-slavonsko-srijemsko-podolsko-govedo> - pristup 16.04.2024.

Slavonsko-srijemski podolac najugroženija je pasmina hrvatskoga goveda. Pred kraj 20.st. pasmina je bila na rubu opstanka. Zbog želje za očuvanjem pasmine 1997. godine je pokrenut program sustavne zaštite ukupne populacije podolca. Danas je pasmina u uzlaznome trendu, kao što se da vidjeti u grafu 3-3, makar se i dalje smatra kritično ugroženom pasminom.

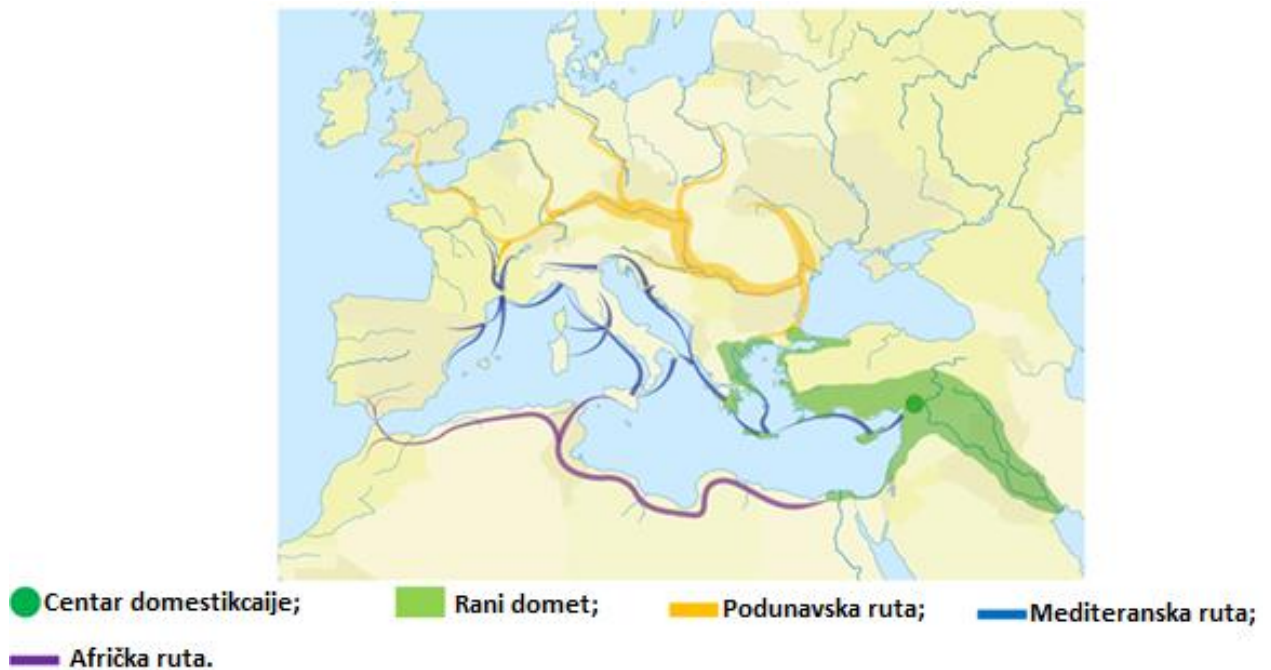


Graf 3-3. Veličina populacije slavonsko-srijemskoga podolca u zadnjih 10 godina.

Izvor: FAO, 2024

### 3.4. Migracije goveda

Migracije goveda diljem Europe kroz prošlost značajno su oblikovale genetsku raznolikost i prilagodljivost modernih europskih pasmina goveda. Razumijevanje ovih migracijskih obrazaca ključno je za očuvanje genetskih resursa i upravljanje programima uzgoja goveda. Govedo je prvi put pripitomljeno na Bliskom Istoku prije otprilike 10 500 godina (Durham i sur. 2005.). Pripitomljena goveda, koja potječu od divljih aurocha (*Bos primigenius*), raširila su se Europom s ranim neolitskim poljoprivrednicima (Helmer i sur. 2005.). Širenje stočarstva u Europu usko je povezano s neolitskom ekspanzijom, koja je započela oko 7000. pr.Kr. Kako su rani farmeri migrirali s Bliskog Istoka u Europu, sa sobom su doveli domaće životinje, uključujući goveda. Ta je migracija išla dvjema glavnim rutama: sredozemnom rutom duž obale i podunavskom rutom kroz srednju Europu (slika 3-6.) (Balaresque i sur. 2015., Milisauskas 2002.). Tijekom brončanog i željeznog doba, ljudska društva u Europi postala su složenija, što je dovelo do povećanja trgovine i kretanja stoke (Bartosiewicz 2013.). Uvođenje kotača i poboljšanje transporta omogućilo je kretanje stoke na veće udaljenosti. Rimsko Carstvo odigralo je značajnu ulogu u širenju pasmina goveda diljem Europe (MacKinnon 2004.). Rimske poljoprivredne prakse i stvaranje poboljšane cestovne mreže olakšali su kretanje stoke i razmjenu rasplodne stoke diljem carstva (MacKinnon 2004.). U tom su razdoblju u sjevernu i zapadnu Europu uvedene mediteranske pasmine goveda. Raspad Rimskog Carstva i naknadne migracije raznih plemena tijekom ranog srednjeg vijeka doveli su do daljnjeg miješanja populacija goveda (MacKinnon 2004.). Ekspanzija Vikinga, na primjer, uvela je skandinavske pasmine goveda na Britansko otočje i druge dijelove Europe (O'Sullivan i sur. 2010.).



Slika 3-6. Migracijske putanje goveda kroz Europu.

Izvor: Felius i sur. 2014.

Razvoj modernih pasmina goveda započeo je u 18. i 19. stoljeću osnivanjem pasminskih društava i registara. Praksa selektivnog uzgoja dovela je do stvaranja modernih pasmina goveda. Uvođenje pasmina goveda iz Novog svijeta, kao što su holstein i hereford, dodatno je diverzificiralo europsku populaciju goveda (Felius i sur. 2010). Povijesne migracije goveda ostavile su složeno genetsko nasljeđe u modernim europskim pasminama goveda. Studije koje su koristile markere mitohondrijske DNA i Y-kromosoma otkrile su značajnu genetsku raznolikost unutar i između pasmina (Medugorac i sur. 2009.). Napori očuvanja usmjereni su na očuvanje ove genetske raznolikosti kako bi se održala prilagodljivost i otpornost populacije goveda.



## 4. Materijali i metode

Genomski podatci za tri hrvatske pasmine goveda dobiveni su pomoću Illumina Bovine HD BeadChip (777 K), a analizirani su iz uzoraka krvi 112 jedinki u sklopu projekta „ANAGRAMS“, dok su ostali genomski podatci bili prikupljeni iz javno dostupnih repozitorija. Od tih prikupljenih podataka je tada napravljen zajednički set podataka kojim se služilo u daljnjim analizama (Tablica 4-1.).

### 4.1. Izrada seta podataka

Analizirani skup podataka sadržavao je SNP podatke za cijeli genom za tri autohtone hrvatske pasmine goveda: slavonsko-srijemski podolac (CCSSP), istarsko govedo (CCIG) i buša (CCB) sa 112 jedinki. Za usporedbu genetske povezanosti između hrvatskih i ostalih pasmina i za analize strukture populacije i primjese uzoraka, također se koristilo genotipizirani podatci iz dvanaest slijedećih pasmina iz Europe: angus (ANG), smeđe govedo (BSW), chianina (CHI), fleckvieh (FLV), Hereford (HFD), Holstein (HOL), limousin (LMS), maltese (MAL), maremmana (MAR), merchigiana (MCG), piedmontese (PIE), romanian grey (RMG), romagola (ROM) te šest slijedećih afričkih pasmina: n'dama (NDA), ankole-watussi (ANW), nganda (NGA), east african zebu (AZB), sokoto guali (UGA), karamojog zebu (NGE) i 3 slijedeće indijske pasmine: gir (GIR), lohari (LOH) i tharparkar (THA). Broj genotipiziranih životinja za svaku pasminu naveden je u tablici 4.1.1. Zbog specifičnog geografskog i povijesnog položaja balkanskoga poluotoka očekivanje je da postoji nekakva veza između hrvatskih i ostalih pasmina. Svaka od ovih pasmina može se smatrati distinktno populacijom s vlastitim setom alelnih frekvencija, mutacija i genetskih kombinacija. Ova genetska raznolikost pasmina omogućuje dubinsko istraživanje evolucijskih putova, fluktuaciju populacija i migracijskih događaja. Različite pasmine često imaju jedinstvene haplotipske strukture, koje su rezultat povijesnih selektivnih pritisaka, geografske izolacije ili specifičnih uzgojnih praksi. Genomski podatci o ostalim pasminama bili su prikupljeni s javno dostupnih repozitorija. U početku su se setovi podataka razlikovali u broju SNP-ova te se spajanje setova podataka u finalni provelo putem PLINK v 1.9 softvera (Purcell i sur. 2007.). Kontrola kvalitete podataka genotipizacije provedeni su s PLINK v 1.9 korištenjem slijedećih parametara kontrole kvalitete: uzeti su samo autosomni SNP-ovi s poznatim kromosomskim položajima kako bi se isključila pristranost između muških i ženskih jedinki; isključeni su svi pojedinci i SNP sa stopom poziva ispod 0.9. Nakon kontrole kvalitete konačna baza podataka sadržavala je 439 608 SNP markera i 674 životinja.

Tablica 4-1. Tablica pasmina korištenih u analizama

Pasmina	Kod	N	Broj SNP	Izvor
Angus	ANG	37	727,115	Barbato i sur. 2020.
Ankole-Watussi	ANW	25	727,115	Barbato i sur. 2020.
East African Shorthorn zebu	AZB	19	777,962	Bahbahani i sur. 2017.
Smeđe govedo	BSW	54	727,115	Barbato i sur. 2020.
Buša	CCB	40	695,074	Držaić et al, 2023
Istarsko govedo	CCIG	40	695,074	Držaić et al, 2023
Slavonsko-srijemski podolac	CCSSP	32	695,074	Držaić et al, 2023
Chianina	CHI	16	727,115	Barbato i sur. 2020.
Fleckvieh	FLV	55	727,115	Barbato i sur. 2020.
Gir	GIR	28	727,115	Barbato i sur. 2020.
Hereford	HFD	24	727,115	Barbato i sur. 2020.
Holstein	HOL	55	727,115	Barbato i sur. 2020.
Limousin	LIM	40	727,115	Barbato i sur. 2020.
Lohari	LOH	13	727,115	Barbato i sur. 2020.
Maltese	MAL	4	777,962	Upadhyay i sur. 2016.
Maremmana	MAR	5	777,962	Upadhyay i sur. 2016.
Merchigiana	MCG	13	727,115	Barbato i sur. 2020.
N'Dama	NDA	48	727,115	Barbato i sur. 2020.
Nganda	NGA	26	727,115	Barbato i sur. 2020.
Sokoto gudali	NGE	13	777,962	Bahbahani i sur. 2017.
Piedmontese	PIE	24	727,115	Barbato i sur. 2020.
Romanian grey	RMG	4	777,962	Upadhyay i sur. 2016.
Romagnola	ROM	30	727,115	Barbato i sur. 2020.
Tharparkar	THA	13	727,115	Barbato i sur. 2020.
Karamojong zebu	UGA	15	777,962	Bahbahani i sur. 2017.

## 4.2. Analiza genomske raznolikosti

Opažena heterozigotnost ( $H_o$ ), očekivana heterozigotnost ( $H_e$ ) i  $F_{is}$  za svaku populaciju pasmina goveda izračunati su s pomoću PLINK v1.90 (Purcell i sur. 2007., Chang i sur. 2015.). Procjene heterozigotnosti osjetljive su na različite pristranosti utvrđivanja kada se SNP-ovi otkriveni u jednoj pasmini koriste za genotip drugih pasmina (Nielsen 2004., Edea i sur. 2015.). Alelna bogatstvo i privatni aleli unutar populacija izračunati su korištenjem metode rarefrakcije za prilagodbu za različite veličine populacija s pomoću Alelic Diversity AnalyZEr (ADZE) (Szpietch i sur. 2008.). Koeficijent inbridinga izračunat je s pomoću paketa detectRUNS (Biscarini i sur. 2019.) u programu R. Procijenjen je putem duljine ROH segmenata (>1mb, >2mb, >4mb, >8mb, >16mb) gdje nam duljina segmenata daje uvid o tome koliko vremena je proteklo od sparivanja u srodstvu. Veliki segmenti upućuju na nedavno sparivanje u srodstvu, dok mali na sparivanje srodnih jedinki u prošlosti (Nosrati i sur. 2021.).

## 4.3. Procjene sličnosti populacija

Analize  $F_{st}$ -a su izračunate s pomoću PLINK v1.9 (Purcell i sur. 2005), uzevši u obzir pristranost veličine populacija na samu analizu. Naime, kada govorimo o izračunima u PLINK-u treba pripaziti na veličine uzoraka populacija koje mogu nepovoljno utjecati na rezultate analize (Albrechtsen i sur. 2021). Uzevši pristranost veličine uzoraka u obzir analize  $F_{st}$ -a su rađene samo između onih populacija koje su bile veće od 20 jedinki. Analiza glavnih komponenti (PCA) provedena je u R za dvije različite veličine populacija. Napravljena je za populacije koje imaju više od dvadeset i za one koje imaju više od 10 jedinki. Za procjenu varijacijskih autokodera (POPVAE) korišten je softver popVAE (Battey i sur. 2020.) koji uklapa varijacijski autokoder u skup genotipova i ispisuje latentni prostor. Splittree (Huson i Bryant 2006.) je korišten za analizu i vizualizaciju neighbor – net-a. Neighbor-net je metoda koja se temelji na udaljenosti. Najbliže je povezana s piramidalnim grupiranjem i podijeljenom dekompozicijom. Piramidalno grupiranje, kao Neighbor-Net, radi aglomerativno, tj. svrstava individualne elemente u zasebne grupe. Mreže su vizualizirane za jedinke (preko p distanci) i pasmine (nei distance). Za analizu strukture populacija provedena je analiza temeljena na Bayesovom modelu u softveru STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard i sur. 2000.). Ovaj softver pretpostavlja model u kojem postoji K populacija (klastera), koje doprinose genotipu svake jedinke i svaka je karakterizirana skupom frekvencija alela na svakom lokusu markera. Metoda

pokušava dodijeliti jedinke populacijama na temelju njihovih genotipova, dok istovremeno procjenjuje frekvencije alela izvorne populacije. Monte Carlo Markovljeva lančana metoda korištena je za procjenu učestalosti alela u svakoj od K populacija i stupnja primjesa za svaku pojedinu životinju. Broj klastera je izveden korištenjem pet neovisnih ciklusa s 1 000 000 ponavljanja i razdobljem izgaranja od 10 000 prema modelu porijekla primjesa i koreliranih frekvencija alela s K vrijednostima u rasponu od dva do dvadeset pet. Vizualizacija rezultata STRUCTURE analize je rađena pomoću StructureSelector (Li i Liu 2017.).

#### **4.4. Efektivna veličina populacije**

Efektivna veličina populacije ( $N_e$ ) hipotetske idealne populacije može se definirati kao veličina koja bi rezultirala istom količinom genetskog pomaka kao što je opaženo u stvarnoj populaciji (Wright, 1931.). Ovaj je parametar ključan za razumijevanje evolucije populacije (Hill i Mackay 2004.) i pomaže u modeliranju i razumijevanju genetske arhitekture koja leži u osnovi složenih svojstava (Hayes i sur. 2003.). Procjena veličine populacije provedena je s pomoću softvera GONE (Santiago i sur. 2020.). Pristup procjene u GONE-u temelji se na odnosu između neravnoteže u povezivanju gameta i/ili gena i efektivne veličine populacije (Hill 1981.), izračunatog kroz pristup složenog modeliranja. Genetski algoritam u GONE (Coombs i sur. 2012.) izvodi povijesni niz efektivnih veličina populacije koji najbolje minimizira zbroj kvadrata razlika između promatranih  $D$  vrijednosti (srednja kvadratna korelacija između dviju frekvencija alela na lokusu, ponderirana njihovom varijancom i one predviđene za odgovarajuće demografske putanje (Saura i sur. 2021.). Uz to, korišten je softver GONE za procjenu trenutne i povijesne  $N_e$  uključujući fazirane genotipske informacije. Faziranje je izvršeno korištenjem genetskog modela s rekombinacijom, korištenjem zadanih opcija u softveru SHAPEIT2 (Delaneau i sur. 2013.). Povijesne procjene produžile su do 50 generacija, što je ekvivalentno približno 250 godina, uzimajući u obzir generacijski interval od 5 godina kod goveda (Scheffers i Weigel 2012.).

## 4.5. Analize migracije gena

Procjene migracija između populacija izračunate su pomoći TreeMix softvera (Pickrell i Pritchard 2012). TreeMix modelira genetski pomak na polimorfizmima cijelog genoma kako bi zaključio o odnosima i protoku gena između populacija. Program procjenjuje genetske odnose i događaje migracije među pasminama, modeliranjem genetskog pomaka na polimorfizmima diljem genoma. Dendrogram najveće vjerojatnosti generiran je na temelju opažene strukture kovarijance između pasmina. Kada pasmine nisu odgovarale račvanju na stablu, dodan je događaj primjesa. Kao input za softvere su postavljeni haploblokovi od 20 SNP-ova te bootstrap od 10000. Outputi dobiveni s pomoću treemix-a tada su analizirani u RStudio s pomoću paketa optM, koji procjenjuje optimalni broj migracija između populacija po Evanno metodi. Također, vizualizacija outputa rađena je u RStudio.

## 5. Rezultati i rasprava

### 5.1. Parametri genetske raznolikosti

Rezultati dobiveni za hrvatske pasmine goveda pružaju značajne informacije o genetskoj strukturi i diverzitetu ovih vrsta. Procjene genetske raznolikosti ( $H_o$ ,  $H_e$ , FIS,  $A_r$ ,  $A_r(p)$ ) na temelju varijabilnosti SNP-ova prikazani su u tablici 5-1. Raspon za promotrenu heterozigotnost 25 analiziranih pasmina iznosio je između 0.18 (ROM) i 0.33 (CCIG), među hrvatskim pasminama najmanju promotrenu heterozigotnost ima buša (CCB). Raspon očekivane heterozigotnosti poprima vrijednosti između 0.16 (ROM) i 0.32 (CCIG), a između hrvatskih pasmina buša (CCB) ponovno ima najmanju heterozigotnost. Tri hrvatske pasmine imaju veću heterozigotnost od prosjeka svih 25 pasmina. Dobiveni rezultati heterozigotnosti imaju određenu razinu podudarnosti s radom koga je proveo Blott i sur. (2003). Parametar koeficijenta fiksacije mjeri se u rasponu između -1 i 1. Dok se negativne Fis vrijednosti tumače kao sklonost outbridingu ili izbjegavanju parenja s bliskim srodnicima, pozitivne Fis vrijednosti ukazuju na srodstvo ili parenje između bliskih srodnika. Prilično velike razlike u procijenjenim fiksacijskim indeksima uočen je između ovih 25 pasmina. Najmanji procijenjeni fiksacijski indeks ima pasmina RMG (-0.345), a najveći ima HFD (0.053). Iz tablice se također može iščitati da su pasmine kod kojih je učestalije sparivanje u srodstvu ANG, AZB, CCIG i HFD dok se kod svih ostalih pasmina prakticira izbjegavanje sparivanja u srodstvu. Jedina hrvatska pasmina kod koje se pojavljuje pozitivan Fis je istarsko govedo, a može se pripisati uzgojno-seleksijskom programu čiji je cilj povećati proizvoljna svojstva pasmine. Rezultati alelnog bogatstva, izračunati s pomoću ADZE softwera, prikazuju sam broj alela i privatnih alela za svaku pasminu. Najveće alelno bogatstvo ( $A_r$ ) ima hrvatsko istarsko govedo, dok najmanje ima talijanska maremmna. Male vrijednosti  $A_r$  kod pasmina kao što su MAR i RMG dijelom mogu biti objašnjeni s malom veličinom uzorka. Naime, veća je šansa da će se u velikom uzorku nalaziti više različitih alela što samim time povećava alelno bogatstvo, dok je kod malih uzoraka ta šansa manja (Leberg 2008.). U prosjeku najveće vrijednosti  $A_r$  imaju afričke pasmine s 11, potom europske s 9 i na kraju indijske sa 7. Velike vrijednosti  $A_r$  kod afričkih pasmina ukazuju na njihovu vrijednost kao rezervoar genetske varijabilnosti. Kod vrijednosti privatnoga broja alela nisu uočene velike razlike između pasmina. Zanimljivo je napomenuti kako europske pasmine imaju najveće i manje vrijednosti alelnog bogatstva i privatnoga broja alela.

Tablica 5-1. Tablica genetskih parametra pasmina.

Pasmina	Ho	He	FIS	Ar	Ar(p)
ANG	0.29±0.19	0.29±0.18	0.005	10±3.45	3±1.08
ANW	0.3±0.19	0.29±0.17	-0.016	13±5.03	4±1.38
AZB	0.28±0.19	0.29±0.17	0.007	11±4.62	4±1.47
BSW	0.28±0.20	0.27±0.18	-0.042	9±3.08	3±1.02
CCIG	0.33±0.17	0.32±0.16	0.016	15±6.37	4±1.48
CCSSP	0.29±0.18	0.29±0.17	-0.043	11±3.96	3±1.15
CCB	0.28±0.20	0.27±0.18	-0.005	9±2.71	3±0.7
FLV	0.29±0.20	0.28±0.18	-0.035	8±2.95	2±0.7
GIR	0.30±0.19	0.29±0.18	-0.010	11±3.96	3±1.18
HFD	0.21±0.19	0.21±0.18	0.053	11±4.01	3±1.18
HOL	0.29±0.18	0.31±0.17	-0.020	10±3.22	3±1.06
CHI	0.30±0.19	0.29±0.18	-0.042	11±3.27	3±1.13
LMS	0.30±0.18	0.30±0.17	-0.008	12±4.66	4±1.28
LOH	0.20±0.21	0.19±0.19	-0.063	7±2.36	3±1.04
MAL	0.23±0.26	0.2±0.19	-0.175	8±2.93	3±1.23
MAR	0.29±0.25	0.27±0.19	-0.074	3±0.85	2±0.44
MCG	0.31±0.21	0.29±0.18	-0.059	4±1.54	3±0.79
NGA	0.24±0.18	0.24±0.18	-0.044	11±4.38	3±1.12
NDA	0.32±0.19	0.30±0.17	0.026	13±4.98	4±1.42
NGE	0.30±0.20	0.29±0.17	-0.032	8±3.34	4±1.43
PIE	0.32±0.19	0.31±0.17	-0.029	13±4.89	4±1.38
RMG	0.30±0.19	0.29±0.17	-0.345	4±1.14	3±0.83
ROM	0.18±0.23	0.16±0.19	-0.029	11±3.88	3±1.17
THA	0.29±0.20	0.28±0.17	-0.116	5±1.55	3±0.77
UGA	0.30±0.20	0.29±0.18	-0.028	10±4.17	4±1.47

Ho - promotrena heterozigotnost,; He – očekivana heterozihotnost; Ar – alelni bogotstvo (rarefrakcija); Ar(p) –  
privatni broj alela (rarefrakcija)

(ANG-Angus, ANW-Ankole-Watussi, AZB-Afrički zebu, BSW-Smeđe govedo, CCB-Buša, CCSSP-Slavonsko-srijemski podolac, CCIG-Istarsko govedo, CHI-Chianina, FLV-Fleischvieh, GIR-Gir, HFD-Hereford, HOL-Holstein, LMS-Limousin, LOH-Lohari, MAL-Maltese, MAR-Marammana, MCG-Merchigiana, NDA-N'dama, NGA-Nganda, NGE-Sokoto gualdi, PIE-Piedmontese, RMG-Romanian grey, ROM-Romagnola, THA-Tharparkar, UGA-Karamojong zebu)

## 5.2. Efektivna veličina populacije

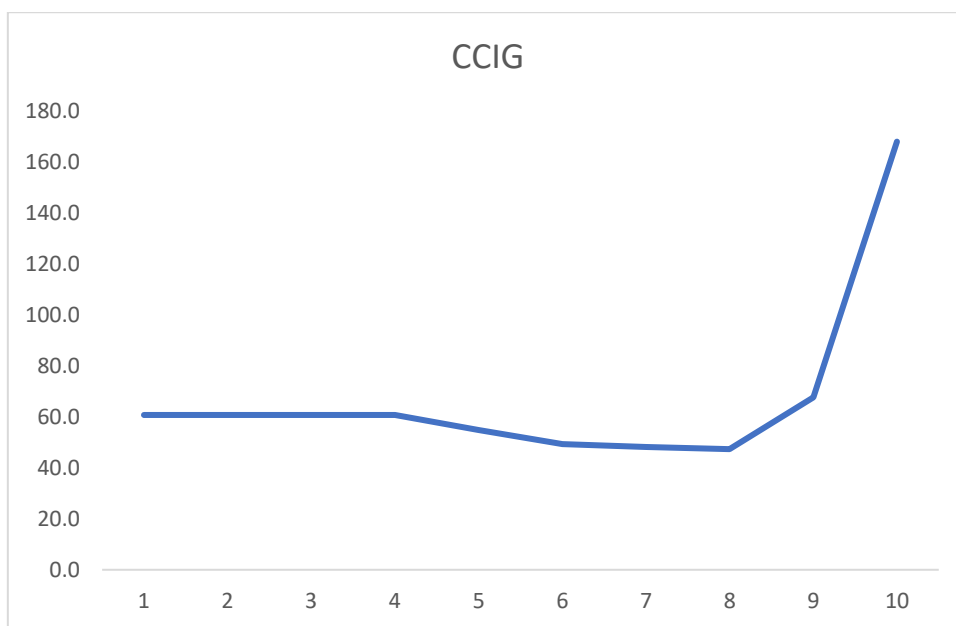
Procjena efektivne i „ancestral“ efektivne veličine populacije odrađena je u GONE softveru. Iz tablice 5-2. može se iščitati efektivna veličina populacije izračunata preko varijabilnosti SNP-ova za trenutnu generaciju, a isto tako se vidi „ancestral“ veličina populacije pedeset generacija unazad. Ancestralni Ne pruža uvid u povijesnu genetsku raznolikost i demografske događaje kao što su „bottleneck“ i širenja koja su oblikovala sadašnju populaciju. Preko procijenjenih parametara iz tablice 5-2. vidi se da hrvatske pasmine goveda imaju male efektivne veličine populacija, što se može povezati s njihovim ugroženim statusom. Između tri pasmine da se primijetiti da je slavonsko-srijemski podolac najugroženiji. Kod svih hrvatskih pasmina primjetan je drastičan pad efektivne veličine populacije u zadnjih 10 generacija, koji je uvjetovan dolaskom komercijalnih pasmina goveda zbog kojih autohtone pasmine izlaze iz trenda. Pozitivni trendovi oporavka u zadnjih 5 generacija mogu se primijetiti kod istarskoga goveda (graf 5-1.) i slavonsko-srijemskog podolca (graf 5-2.), dok za bušu taj trend stagnira (graf 5-3.). Buša također ima najveći pad efektivne veličine populacije tako da današnja populacija ima samo 7 % od prijašnjih generacija. Između svih 25 pasmina AZB ima najveću efektivnu veličinu populacije dok najmanju ima MAL. Maltese (MAL) je pasmina koja je uzgajana na Malti, pa je i za očekivati da će joj genetski parametri poput efektivne veličine populacije biti znatno manji od ostalih. Naime smanjena genetska varijabilnost, veličina populacije i slična svojstva česta su pojava kod otočnih pasmina ili pasmina koje su izolirane. U takvom načinu uzgoja sparivanje u srodstvu je gotovo neizbježno, što će tijekom vremena dovesti do erozije genetske strukture same pasmine.



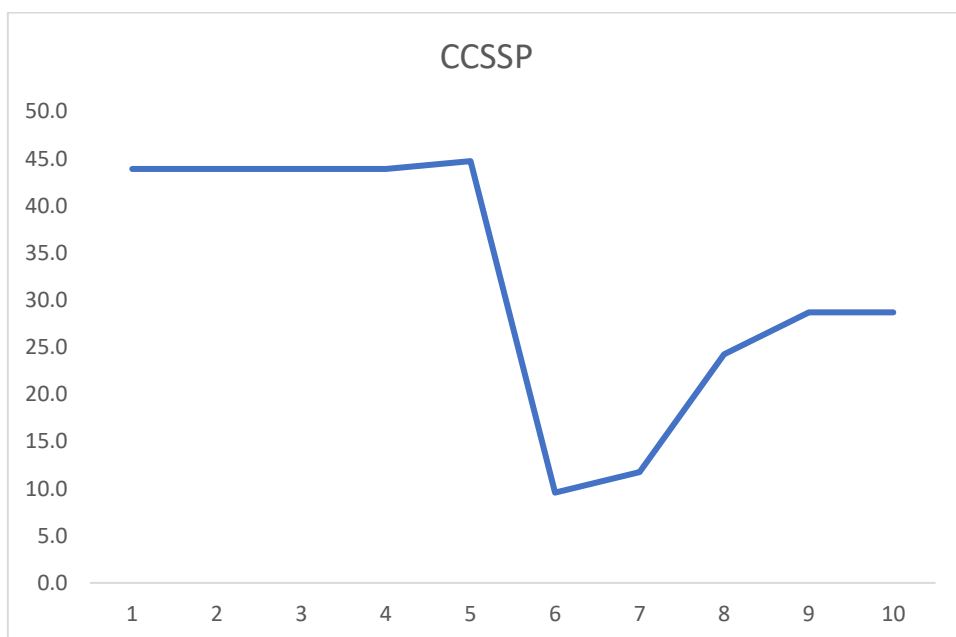
Tablica 5-2. Efektivna veličina populacije procijenjena na 50 generacija.

Pasmina	1. gen	10. gen	20. gen	30.gen	40.gen	50.gen
ANG	166	171	151	168	1094	4171
AMW	400	4768	6222	4831	3661	1870
AZB	2157	4130	8531	9327	8676	9062
BSW	76	50	3251	7465	7870	8796
CCIG	60	168	5312	6114	6147	6075
CCSSP	43	28	204	362	432	391
CCB	138	19192	18922	19037	17753	19700
FLV	83	189	1831	1702	1568	1708
GIR	122	799	1844	1707	1699	1933
HFD	164	120	89	92	510	8085
HOL	68	76	2378	2580	2435	2818
CHI	141	117	131	2315	4171	4528
LMS	206	431	1935	1862	1864	1862
LOH	22	1124	1072	1643	2723	4269
MAL	25	5	43	46	48	48
MAR	52	1042	3328	3822	3957	3730
MCG	90	91	2792	3007	3097	3517
NGA	40	59933	67859	57675	55791	49384
NDA	53	4511	4609	4029	4040	3993
NGE	712	3006	3743	3416	2695	1884
PIE	167	4835	5507	5020	4200	3839
RMG	51	28	39	61	72	82
ROM	103	93	2254	3437	3582	3688
THA	13	27	134	467	590	526
UGA	334	2625	23542	24554	25507	20132

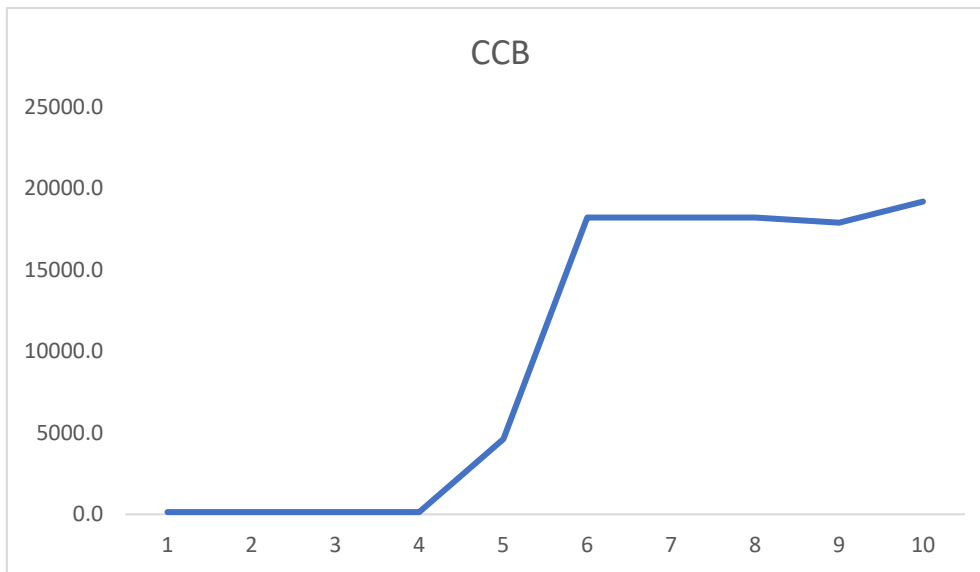
(ANG-Angus, ANW-Ankole-Watussi, AZB-Afrički zebu, BSW-Smeđe govedo, CCB-Buša, CCSSP-Slavonsko-srijemski podolac, CCIG-Istarsko govedo, CHI-Chianina, FLV-Fleischviech, GIR-Gir, HFD-Hereford, HOL-Holstein, LMS-Limousin, LOH-Lohari, MAL-Maltese, MAR-Marammana, MCG-Merchigiana, NDA-N'dama, NGA-Nganda, NGE-Sokoto gualdi, PIE-Piedmontese, RMG-Romanian grey, ROM-Romagnola, THA-Tharparkar, UGA-Karamojong zebu)



Graf 5-1. Efektivna veličina populacije za zadnjih 10 generacija istarskoga goveda.



Graf 5-2. Efektivna veličina populacije za zadnjih 10 generacija slavonsko-srijemskog podolca.



Graf 5-3. Efektivna veličina populacije za zadnjih 10 generacija buše.

Ovako dobiveni rezultati ukazuju da je praćenje efektivne veličine populacije, sa praćenjem genetičke varijabilnosti, veoma značajno za populacijsko genetička istraživanja i ima veliku primjenu u uspostavljanju konzervacijske strategije.

### 5.3 Koeficijenti inbreedinga

Koeficijenti inbreedinga za 439 608 SNP-ova izračunati su s pomoću ROH fragmenata različitih duljina. Procjena inbreedinga odrađena je za segmente veće od 1, 2, 4, 8 i 16 Mb, uzevši u obzir da veći ROH segmenti predstavljaju nedavno sparivanje u srodstvu. FROH procijenjen iz podataka sekvence izravna je i točna procjena razina homozigotnosti. Uglavnom odražava regije koje su bile IBD na genomu. Raspon koeficijenata inbridinga za segmente veće od 1 Mb bio je između 0.13 (CCB) i 0.34 (THA), s prosjekom od 0.22. Za segmente veće od 2 Mb, raspon je bio od 0.01 (ANW) do 0.27 (MAL), s prosjekom od 0.07. Za segmente veće od 4 Mb, raspon je bio od 0.01 (ANW) do 0.26 (MAL), s prosjekom od 0.06. Segmenti veći od 8 Mb imali su raspon od 0.01 (ANW) do 0.09 (CCSSP), s prosjekom od 0.03. Konačno, za segmente veće od 16 Mb, raspon je bio od 0.01 (promatrano u AZB, CHI, GIR, LMS, MCG, PIE, ROM i THA) do 0.04 (CCSSP), s prosjekom od 0.01. Segmenti ROH nastaju zbog mehanizama sparivanja u srodstvu, a njihova duljina ovisi o crossing overu. Naime duljina ROH nam govori o razdoblju koje je prošlo od sparivanja u srodstvu. Djelovanje crossing overa kroz duži period pocijepat će veće segmente u manje (Peripolli i sur. 2018, Forutan i sur. (2018.)). Jedna od pasmina koja ima najveće zabilježene koeficijente je Maltese (MAL) što može biti objašnjeno s time da je ona otopčna izolirana pasmina te da je u takvim uvjetima sparivanje u srodstvu gotovo neizbježno. Koeficijent inbridinga za sve 3 hrvatske pasmine je u granicama normale, tj. nije veći od dopuštenih 5 %. (Margolin i Bartlett 1945.). Dobar uzgojno-seleksijski rad i program te izbjegavanje sparivanja u srodstvu zaslužni su za niske vrijednosti koeficijent inbridinga. Kada govorimo o populacijama koje broje mali broj jedinki i koje su k tome i svrstane u ranjive ili ugrožene vrste, u potpunosti bi trebale izbjegavati sparivanje u srodstvu, kako ne bi došlo do negativnih posljedica za samu pasminu.

Tablica 5-3. Koeficijenti inbreedinga za ROH određenih duljina u Mb.

Pasmina	>1Mb	>2Mb	>4Mb	>8Mb	>16Mb
ANG	0.27	0.12	0.09	0.05	0.02
ANW	0.18	0.01	0.01	0.01	0
AZB	0.18	0.03	0.04	0.02	0.01
BSW	0.25	0.11	0.09	0.05	0.02
CCB	0.13	0.03	0.06	0.05	0.03
CCIG	0.23	0.12	0.1	0.07	0.02
CCSSP	0.23	0.14	0.11	0.09	0.04
CHI	0.22	0.1	0.07	0.03	0.01
FLV	0.2	0.04	0.03	0.02	0.02
GIR	0.24	0.04	0.02	0.01	0.01
HFD	0.32	0.19	0.14	0.09	0.04
HOL	0.22	0.08	0.07	0.04	0.02
LMS	0.19	0.04	0.03	0.02	0.01
LOH	0.27	0.08	0.05	0.02	0
MAL	0.39	0.27	0.26	0.1	0.02
MAR	0.23	0.08	0.03	0.01	0
MCG	0.19	0.07	0.05	0.02	0.01
NDA	0.28	0.04	0.03	0.02	0.02
NGA	0.14	0.02	0.04	0.02	0
NGE	0.15	0.01	0.01	0	0
PIE	0.15	0.01	0.01	0.01	0.01
RMG	0.15	0.02	0.01	0	0
ROM	0.2	0.08	0.06	0.03	0.01
THA	0.34	0.15	0.09	0.03	0.01
UGA	0.16	0	0	0	0

(ANG-Angus, ANW-Ankole-Watussi, AZB-Afrički zebu, BSW-Smeđe govedo, CCB-Buša, CCSSP-Slavonsko-srijemski podolac, CCIG-Istarsko govedo, CHI-Chianina, FLV-Flechviech, GIR-Gir, HFD-Hereford, HOL-Holstein, LMS-Limousin, LOH-Lohari, MAL-Maltese, MAR-Marammana, MCG-Merchigiana, NDA-N'dama, NGA-Nganda, NGE-Sokoto gualdi, PIE-Piedmontese, RMG-Romanian grey, ROM-Romagnola, THA-Tharparkar, UGA-Karamojong zebu)

## 5.4 Procjene sličnosti populacija

### 5.4.1 Fst između populacija

Fst je mjera genetske diferencijacije, mjerena kao smanjenje heterozigotnosti subpopulacija u odnosu na ukupnu populaciju (Weir i Hill 2002.). Fst se izračunava kao korelacija između para nasumičnih alela u subpopulaciji i nasumično odabranih alela iz cijele populacije. Vrijednosti za Fst kreću se između 0 i 1. Niske vrijednosti Fst među subpopulacijama ukazuju na niske razine genetske divergencije u populaciji, gdje vrijednost 0 implicira da nema divergencije između populacija. Visoke vrijednosti Fst ukazuju na veću genetsku diferencijaciju između subpopulacija, što implicira da su jedinke unutar subpopulacija više povezane jedna s drugom u usporedbi s jedinkama između subpopulacija. Fst vrijednost 1 označava potpunu izolaciju subpopulacije od ukupne populacije; drugim riječima, genomska struktura cijele populacije može se objasniti subpopulacijom. Procijenjene vrijednosti Fst prikazane su na slici 5-1. Prosječna vrijednost Fst za sve lokuse i sve jedinke u populaciji iznosila je 0.14. Ovaj rezultat približan je rezultatima prijašnjih istraživanja u kojima su korišteni SNP-ovi, a iznosili su 0.17 (McKay i sur. 2008.). Najniža vrijednost Fst između europskih pasmina zapažena je za BSW i PIE (0.02). Obje pasmine su alpske pasmine, tj. pretežno se uzgajaju na predjelima Alpa, što jednim dijelom može objasniti mali zapaženi Fst. Najmanji Fst afričkih pasmina izračunat je između NGA i ANW (0.03) populacija. Mahadevan i Marples (1961.) u svome radu govore da je nganda (NGA) pasmina nastala križanjem ankola i zebu pasmina, što daje pojašnjenje maloj Fst vrijednosti između te dvije pasmine. Najveći Fst zabilježn je između GIR i HFD, a iznosio je 0.36. Gir je klasičan primjer indijskoga zebu goveda pa je i za očekivati da će imati visoke vrijednosti s europskim pasmina. Hrvatske pasmine između sebe imaju mali Fst, makar rezultati pokazuju da su buša i istarsko govedo sličniji međusobno (0.05) nego sa slavonsko-srijemskim podolcem (0.10). Buši najbližnije pasmine gledajući Fst su istarsko govedo (CCIG) i piedemontese (PIE). Istarskome govedu su najbližnije buša (CCB) i smeđe govedo (BSW). Slavonsko-srijemski podolac najmanje zapažene vrijednosti Fst ima s limousin (LMS) i piemontese (PIE). Iz navedenih rezultata se može zaključiti da su buša i istarsko govedo genetski sličnije pasmine, a da slavonsko-srijemski podolac nije imao previše doticaja s ostalim hrvatskim pasminama. Jedan od razloga te diferencijacije pasmina mogu biti geografske barijere koje su limitirale pristup pasminama. Istarsko govedo i buša su pasmine hrvatskoga priobalja, dok je slavonsko-srijemski podolac

kontinentalna pasmina. Makar buša i istarsko govedo ne obitavaju na istom području (planine-otoci) moguće da su nekad ipak imali kontakt.

Tablica 5-4. Fst vrijednosti između hrvatskih pasmina goveda.

	CCB	CCIG	CCSSP
CCB	-		
CCIG	0.05	-	
CCSSP	0.1	0.1	-

(CCB-Buša, CCIG-Istarsko govedo, CCSSP-Slavonsko-srijemski podolac)

	ANG	ANW	BSW	CCB	CCIG	CCSSP	FLV	GIR	HRR	HOL	LMS	NDA	NGA	PIE
ANG	-													
ANW	0.19	-												
BSW	0.12	0.21	-											
CCB	0.07	0.14	0.08	-										
CCIG	0.10	0.16	0.05	0.05	-									
CCSSP	0.13	0.18	0.08	0.10	0.10	-								
FLV	0.10	0.19	0.06	0.09	0.11	0.11	-							
GIR	0.31	0.15	0.26	0.28	0.29	0.30	0.30	-						
HFD	0.13	0.22	0.10	0.13	0.16	0.13	0.36	0.36	-					
HOL	0.10	0.19	0.07	0.10	0.12	0.09	0.30	0.13	0.13	-				
LMS	0.08	0.17	0.04	0.08	0.10	0.06	0.29	0.11	0.08	0.08	-			
NDA	0.17	0.14	0.12	0.14	0.16	0.15	0.30	0.20	0.16	0.14	0.14	-		
NGA	0.19	0.03	0.15	0.16	0.18	0.18	0.14	0.23	0.19	0.17	0.16	0.16	-	
PIE	0.08	0.16	0.02	0.06	0.10	0.06	0.30	0.10	0.08	0.04	0.14	0.16	0.16	-
ROM	0.11	0.16	0.06	0.08	0.12	0.10	0.28	0.14	0.11	0.09	0.15	0.16	0.07	0.07

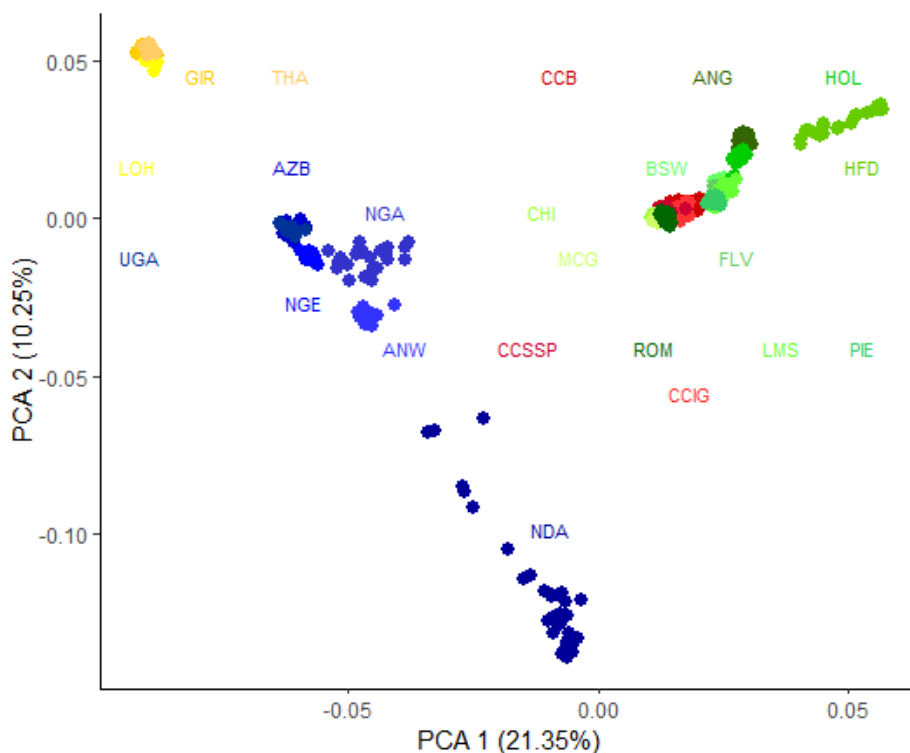
ANG-Angus, ANW-Ankole-Watusi, BSW-Smede govedo, CCB-Buša, CCSSP-Slavonsko-srijemski podolac, CCIG-Istarsko govedo, Flechviech, GIR-Gir, HFD-Hereford, HOL-Holstein, LMS-Limousin, NDA-N'dama, NGA-Nganda, PIE-Piedmontese, ROM-Romagnola,

Slika 5-1. Fst između populacija većih od 20 jedinki.

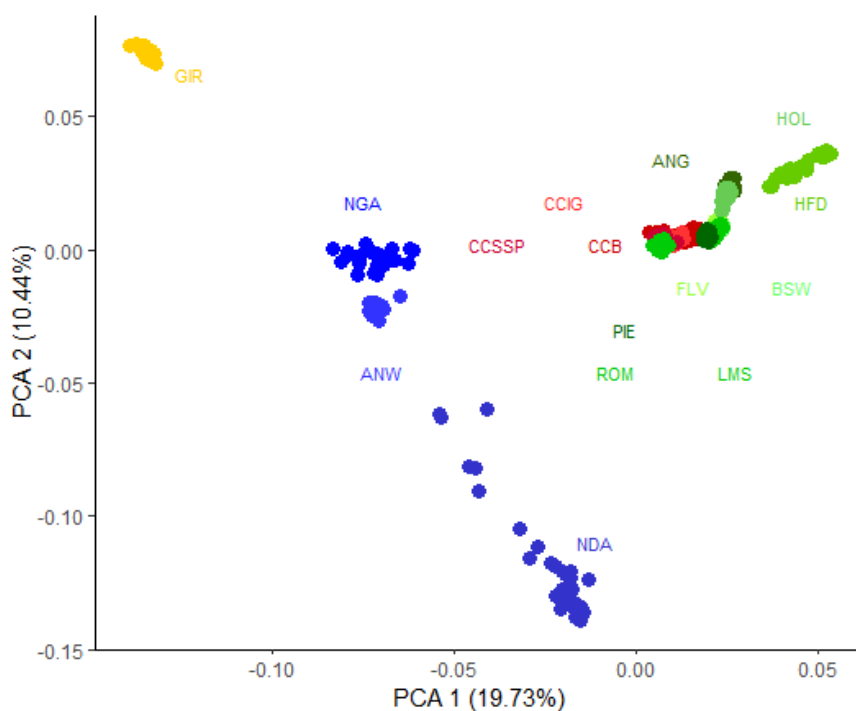


## 5.4.2 PCA

PCA se temelji na matematičkom algoritmu koji smanjuje dimenzionalnost broja moguće koreliranih varijabli (npr. SNP-ova) na manji broj nekoreliranih varijabli (tj. glavnih komponenti), dok zadržava većinu varijabilnosti u skupu podataka koji se istražuje (Jolliffe, 2002). Analiza glavnih komponenti često je korištena analiza vizualizacije genomskih odnosa među pasminama goveda (Kelleher i sur. 2017., Bartolini i sur. 2015.). Analiza glavnih komponenti u ovome radu bila je uspješna u odvajanju klastera pasmina na temelju genotipskih podataka. Analiza je odrađena na 2 seta podataka, setovi koji sadrže više od 10 i 20 jedinki. Prva i duga glavna komponenta za set podataka koji imaju više od 10 jedinki činile su 21.35 % odnosno 10.25% varijance (graf 5-4.), dok kod seta koji je ima samo populacije s 20 ili više jedinki su one iznosile 19.75 % odnosno 10.44 % ukupne varijance (graf 5-5.). PCA je otkrio da su većina pasmina goveda formirale jasne klastere koji se ne preklapaju i predstavljaju odvojene populacije. Također na grafovima 5-4. i 5-5. jasno se vide grupacije goveda po kontinentima. Prva glavna komponenta oslikavala je jasan obrazac razdvajanja između goveda s različitih kontinenata, dok je druga glavna komponenta prikazala razdvajanje afričkih pasmina. Analize glavnih komponenti često vrlo dobro prikazuju geografske diferencijacije između pasmina, pa se tako na slici 5-4. vidi jasna podjela afričkih pasmina, te da se samo jedna afrička pasmina odvojila (NDA). Ndama (NDA) je pasmina zapadne Afrike, dok su ostale pasmine centralne i istočne Afrike, što objašnjava njihovo razilaženje u analizi. Tri indijske pasmine grupirale su se približno u jedan klaster. Većina europskih pasmina zajedno formiraju klastere u neposrednoj blizini i međusobno se preklapaju, dok je hereford (HFD) pasmina koja se odvaja od ostatka. Hereford je britanska pasmina i rezultati dobiveni u ovome radu podudaraju se sa prijašnjim (Kelleher i sur. 2016), po tome da je hereford pasmina koja će se često odvajati od ostalih europskih pasmina. Hrvatske pasmine preklapaju se s nekolicinom ostalih europskih pasmine i formiraju klaster. Buša i istarsko govedo preklapaju se s talijanskim pasminama chianina (CHI), marchigiana (MCG) i romagnola (ROM), dok se slavonsko-srijemski podolac preklapa s fleckvieh (FLV) i limousin (LMS) pasminama. Talijanske pasmine nalaze se u geografskoj blizini buše i istarskoga goveda, međutim prijašnja istraživanja koja su promatrala odnose između istarskoga goveda i talijanskih pasmina (Maretto i sur. 2012.), nisu otkrili značajno podudaranje. Istarskome govedu najbližija pasmina je bila podolica što se moglo pretpostaviti zbog sličnog eksterijera te dvije pasmine.



Graf 5-4. PCA analiza za populacije veće od 10.

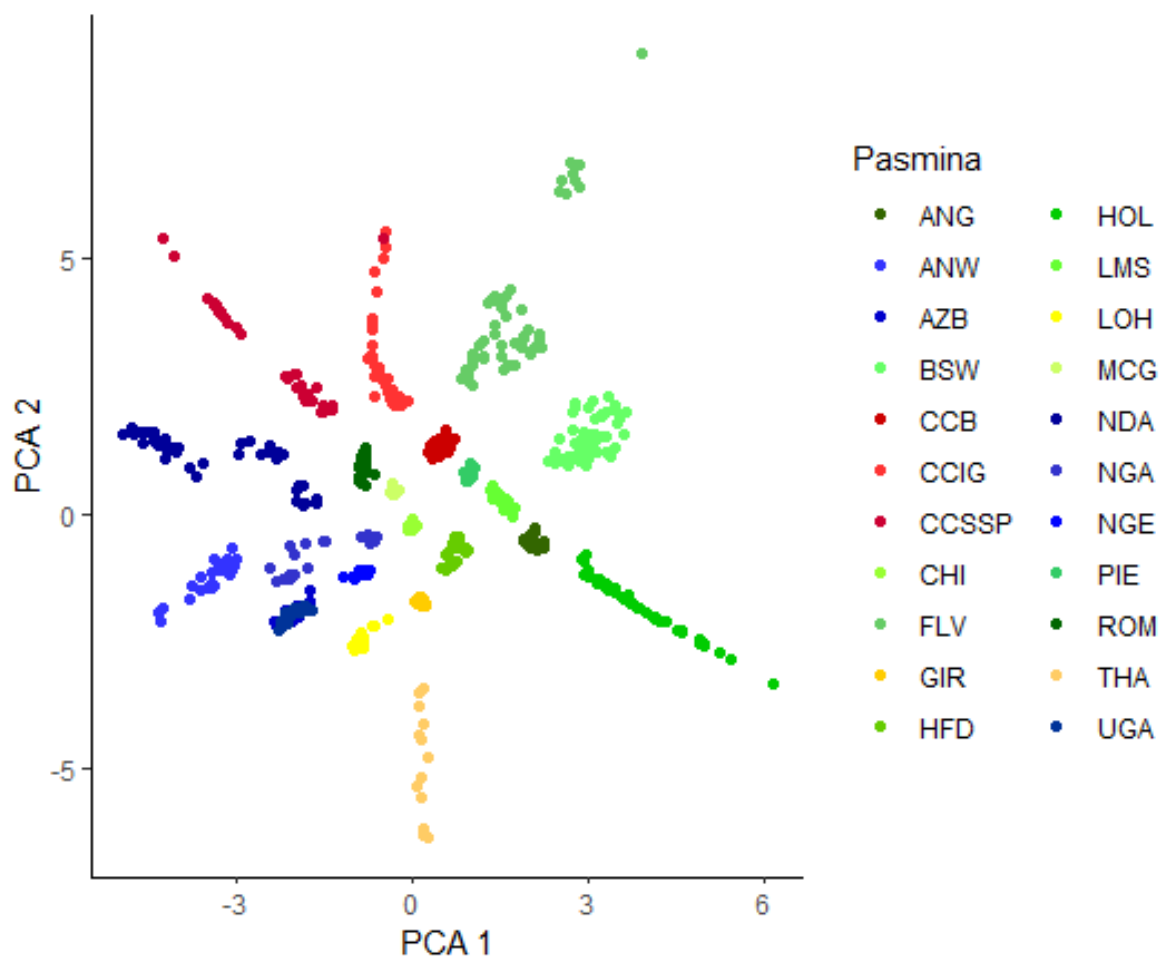


Graf 5-5. PCA za populacije veće od 20.

(ANG-Angus, ANW-Ankole-Watussi, AZB-Afrički zebu, BSW-Smeđe govedo, CCB-Buša, CCSSP-Slavonsko-srijemski podolac, CCIG-Istarsko govedo, CHI-Chianina, FLV-Flechviech, GIR-Gir, HFD-Hereford, HOL-Holstein, LMS-Limousin, LOH-Lohari, MCG-Merchigiana, NDA-N'dama, NGA-Nganda, NGE-Sokoto gualdi, PIE-Piedmontese, ROM-Romagnola, THA-Tharparkar, UGA-Karamojong zebu)

### 5.4.3 POPVAE

Slično analizi glavnih komponenti (PCA), autokoderi rješavaju problem kompresije postupnim smanjivanjem broja ulaznih parametara u manji skup skrivenih parametara, koji su analogni glavnim komponentama. Broj tih skrivenih parametara, poznat kao latentni prostor, ovisi o arhitekturi mreže. U svom najjednostavnijem obliku, ova kompresija se postiže smanjenjem broja parametara u svakom sloju, što je dio mreže poznat kao koder. Drugi dio mreže, nazvan dekoder, rekonstruira izvorne podatke iz latentnog prostora minimiziranjem odgovarajuće funkcije gubitka. Važan dio autokodera je korak regularizacije, obično uključen u funkciju gubitka, koji je potreban za učenje smislenog latentnog prostora i izbjegavanje memoriranja ulaznih podataka. Varijacijski autokoderi (VAE) razlikuju se od običnih autokodera jer uvode generativnu komponentu, sažimajući podatke u latentnu distribuciju prostora. Treba napomenuti da su autokoderi slabo iskorišteni u analizama srodnosti kod domaćih životinja, te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razumjela njihova primjena u animalnoj genetici. Graf 5-6. prikazuje vizualizaciju outputa softvera POPvae (Batty i sur. 2021) s pomoću RStudia. Populacije goveda su se formirale u individualne klastere koji se ne preklapaju, jedino preklapanje se može primijetiti između istočno-afričkog zebu (AZB) i karamojong zebu (UGA). Slika također prikazuje odvajanje pasmina po kontinentu, gdje se jasno vide pasmine Europe (zeleno), Afrike (plavo) i Indije (žuto).

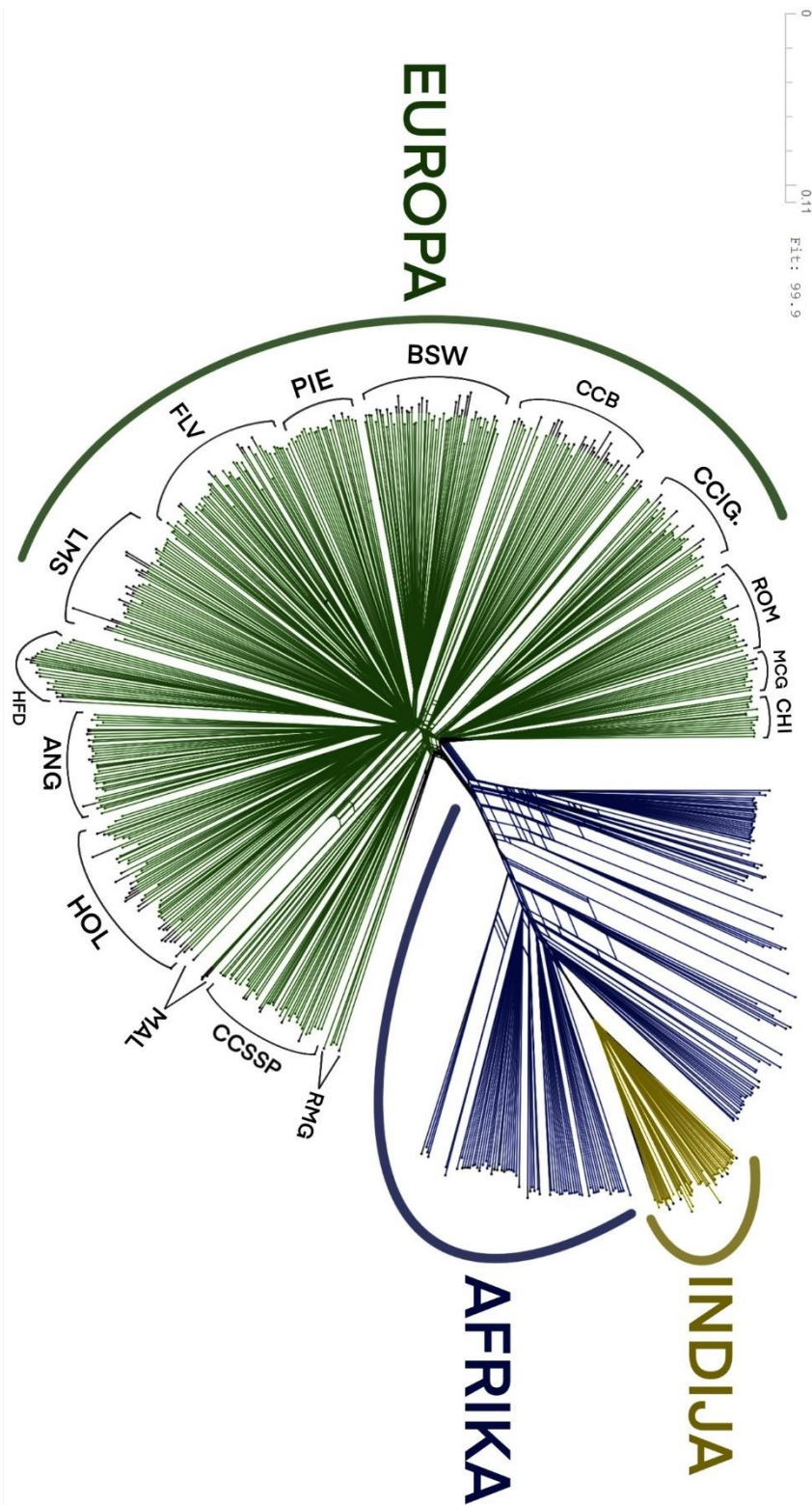


Graf 5-6. Analiza varijacijskih autokodera za populacije s više od 10 jedinki.

(ANG-Angus, ANW-Ankole-Watussi, AZB-Afrički zebu, BSW-Smeđe govedo, CCB-Buša, CCSSP-Slavonsko-srijemski podolac, CCIG-Istarsko govedo, CHI-Chianina, FLV-Flechiech, GIR-Gir, HFD-Hereford, HOL-Holstein, LMS-Limousin, LOH-Lohari, MAL-Maltese, MAR-Marammana, MCG-Merchigiana, NDA-N'dama, NGA-Nganda, NGE-Sokoto gualdi, PIE-Piedmontese, RMG-Romanian grey, ROM-Romagnola, THA-Tharparkar, UGA-Karamojong zebu)

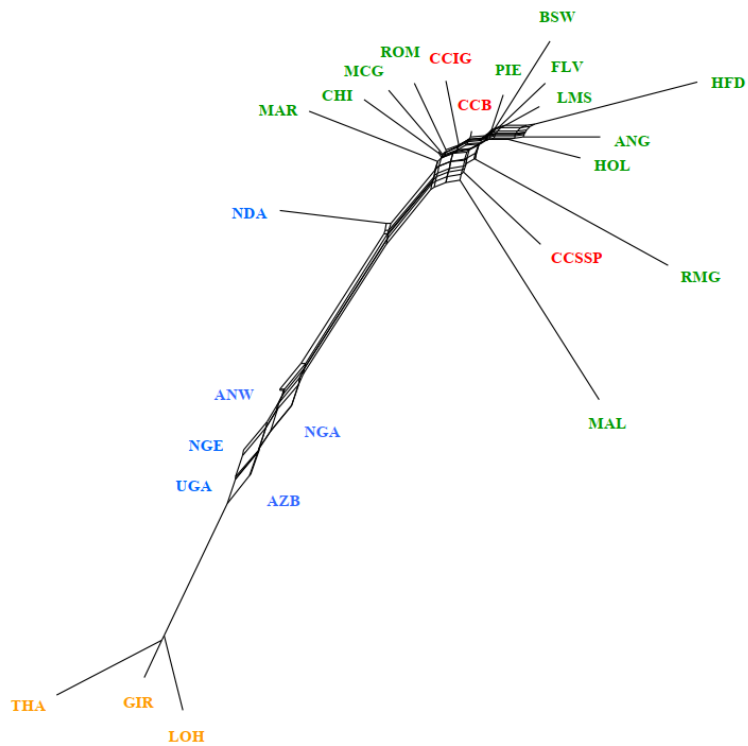
#### 5.4.4 Neighbor-net mreža

Neighbor-net mreže konstruirane s pomoću Splitree softvera za p distance između jedinki (slika 5-2.) i Nei distanci između populacija (slika 5-3.). Neighbor-net mreže također su često korištene analize u populacijskog genetikci (Zinovieva i sur. 2021., Lwin i sur. 2018., Ginja i sur. 2010.). Neighbor-net izrađen preko distanci u oba primjera prikazuje jasnu diferencijaciju pasmina po kontinentima. Zelena boja predstavlja Europu, plava Afriku te žuta Indiju. Na slici 5-2. prikazane su svih 674 životinja. Populacije su jasno definirane konusnim oblicima, te se mogu uočiti koje su pasmine bliže jedna drugoj, promatrajući gdje su zakorijenjene. Rezultati neighbor-net mreže podudaraju se s rezultatima prijašnjih analiza. Vidljivo je da su buša i istarsko govedo bliži međusobno, a slavonsko-srijemski podlac nema podudarnosti niti s jednom hrvatskom pasminom. Neighbor-net mreža napravljena preko Nei distanci između pasmina prikazuje priklanjanje hrvatskih pasmina ostalima. Buša osim što je bliska s istarskim govedom se također formirala u blizini piemontese (PIE) i smeđeg goveda (BSW) koje su jedne od mogućih pasmina koje su bile korištene za oplemenjivanje same buše. Istarsko govedo u blizini je ostalih talijanski pasmina kao što su chianina (CHI), marchigiana (MCG) i romagnola (ROM). Zajedno grupiranje tih pasmina može biti objašnjeno s geografskom bliskošću tih pasmina, makar između svih talijanskih pasmina istarsko govedo najbližije je podolici (Maretto i sur. 2012). Slavonsko-srijemski podolac ukorijenio se u blizini rumunjskog sivog govedom (RMG) makar i dalje postoji određena razina diferencijacije. Pasmine imaju veliku razinu fenotipske podudarnosti, međutim dosadašnja istraživanja utvrdila su da je za nastanak rumunjskoga sivog goveda korištena pasmina simentalac (Oklahoma State University 2016.). Pasmine koje najviše odstupaju od ostalih klastera su hereford (HFD), maltese (MAL) i ndama (NDA). Svaka od tih pasmina se značajno odvaja od ostatka klastera za njihov kontinent. Ndama je pasmina istočne Afrike, dok su ostale, pasmine srednje i istočne Afrike, što može objasniti njeno odvajanje od ostatka afričkih pasmina. Hereford i maltese su otočne pasmine (hereford - Velika Britanija, maltese – Malta) što ih čini izoliranim pasminama. Način na koje su te pasmine izolirane limitira mogućnosti križanja s ostalim pasminama što je jedno od objašnjenja zašto su se te dvije pasmine uvelike odvojile od ostalih europskih pasmina.



Slika 5-2. Neighbor-net mreža p distanci između svih jedinki.

(ANG-Angus, BSW-Smeđe govedo, CCB-Buša, CCSSP-Slavonsko-srijemski podolac, CCIG-Istarsko govedo, CHI-Chianina, FLV-Flechviech, HFD-Hereford, HOL-Holstein, LMS-Limousin., MAL-Maltese, MCG-Merchigiana, PIE-Piedmontese, RMG-Romanian grey, ROM-Romagnola)

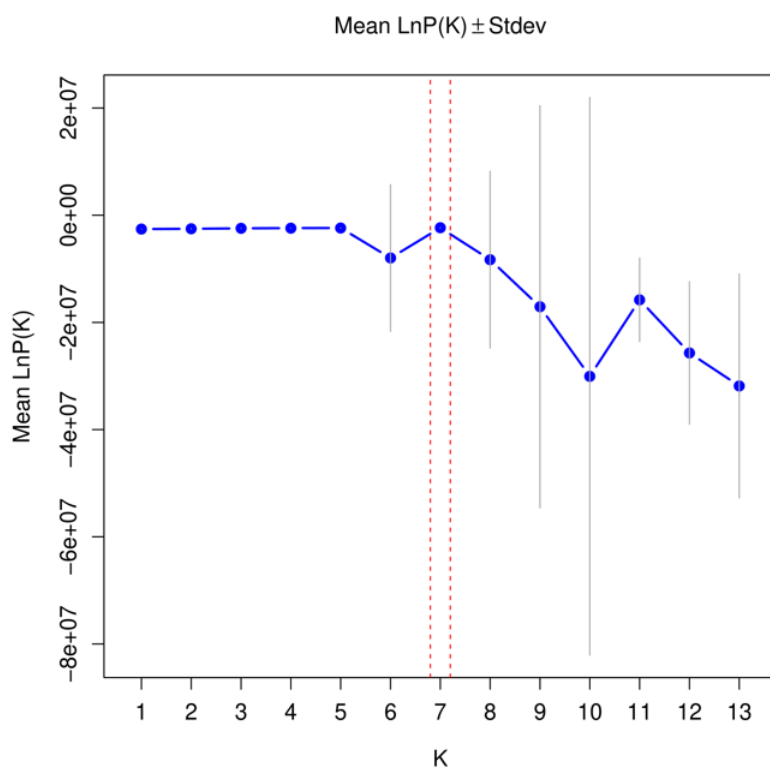


Slika 5-3. Neighbor-net mreža Nei distanci između pasmina.

(ANG-Angus, ANW-Ankole-Watussi, AZB-Afrički zebu, BSW-Smeđe govedo, CCB-Buša, CCSSP-Slavonsko-srijemski podolac, CCIG-Istarsko govedo, CHI-Chianina, FLV-Flechviech, GIR-Gir, HFD-Hereford, HOL-Holstein, LMS-Limousin, LOH-Lohari, MCG-Merchigiana, NDA-N'dama, NGA-Nganda, NGE-Sokoto gualdi, PIE-Piedmontese, ROM-Romagnola, THA-Tharparkar, UGA-Karamojong zebu)

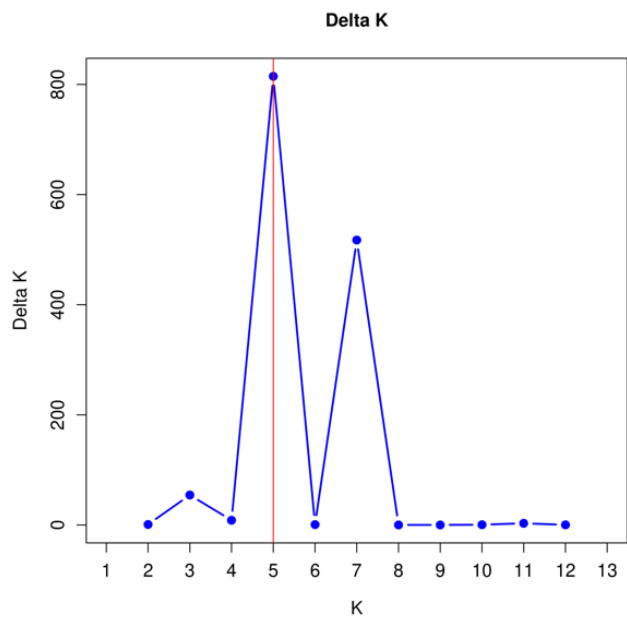
## 5.5. Struktura populacije

Kako bismo identificirali strukturu populacije i procijenili razine primjesa, upotrijebili smo algoritam STRUCTURE, poznat po otkrivanju skrivenih struktura i kvantificiranju primjesa bez potrebe za unaprijed dodijeljenim članstvom u klasteru. Proveli smo analizu STRUKTURE od  $K=1$  do  $K=12$ , za one pasmine koje se smatraju utjecajnim u stvaranju hrvatskih pasmina goveda. Vrijednost  $\text{Ln Pr}(G|K)$  stalno se povećavala do  $K=5$ , gdje se stabilnost između ciklusa istog  $K$  počela smanjivati (graf 5-7.). Najznačajnija promjena u  $\text{Ln Pr}(G|K)$  između uzastopnih vrijednosti  $K$  bila je na  $K=5$  (graf 5-8.). Na temelju preporuka Evanno i sur. (2005.), čini se da je  $K=5$  najprikladnija vrijednost za ovaj skup podataka. Stoga su rezultati STRUCTURE predstavljeni za pripadnost primjesama na  $K=5$ . Dodatno, uključeni su rezultati za  $K=2$ ,  $K=3$  i  $K=12$  kako bi se pokazao proces klasteriranja korišten u ovome radu (slika 5-4.).



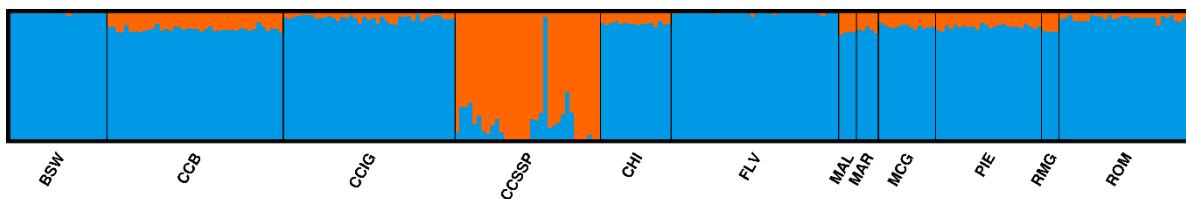
Graf 5-7. Prosječni  $\text{LnP}(K)$  i standardne devijacije.



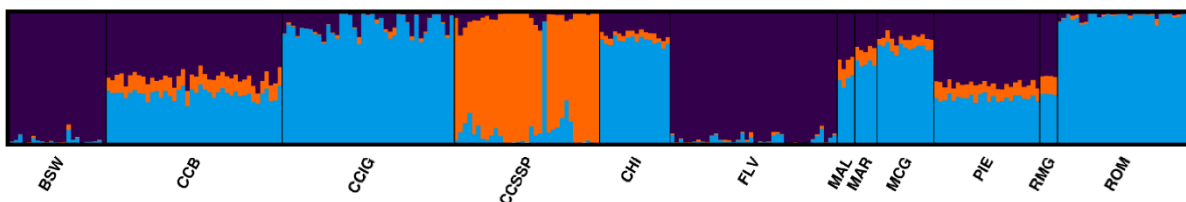


Graf 5-8. Delta K kao funkcija broja klastera.

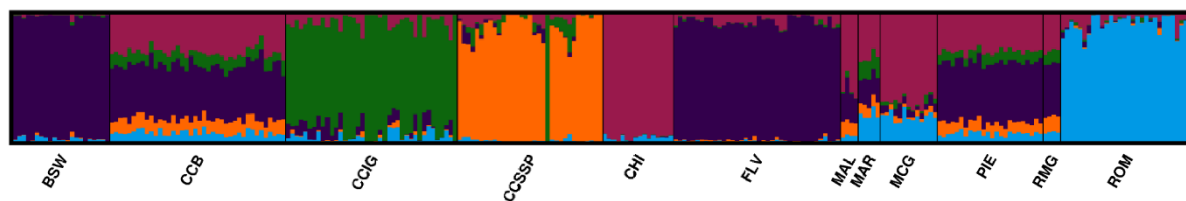
**K = 2**



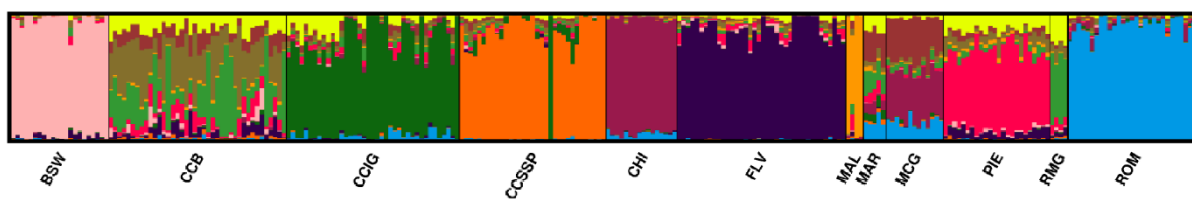
**K = 3**



**K = 5**



**K = 12**



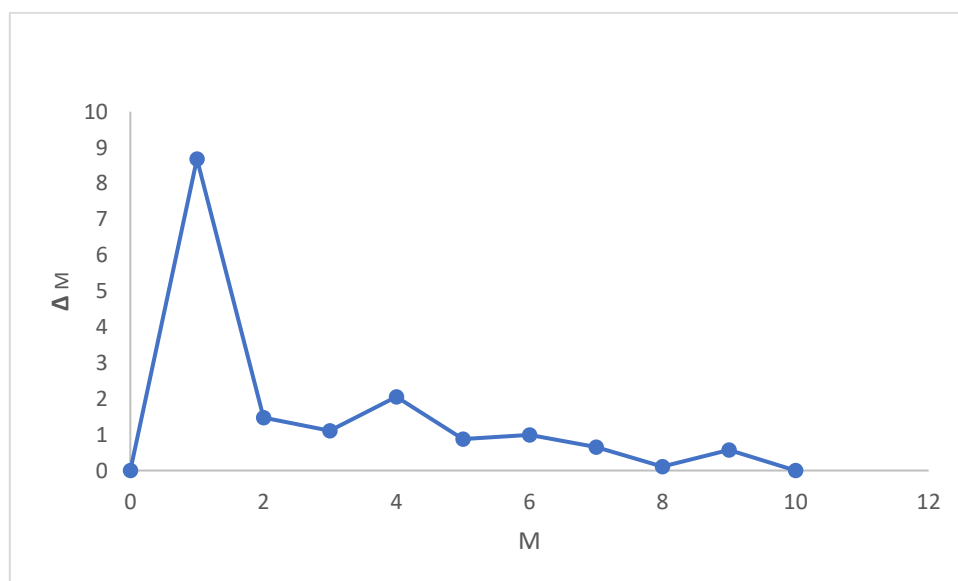
Slika 5-4. Struktura populacija goveda za  $K = 2$ ,  $K = 3$ ,  $K = 5$  i  $K = 12$ .

(BSW - smeđe govedo, CCB – buša, CCIG – Istarsko govedo, CCSSP – slavonsko srijemski podolac, CHI – chianina, FLV - fleckvieh, MAL – maltese, MCG – marchigiana, MAR – maremmana, PIE – piedemontese, RMG – romanian grey, ROM – romangola)

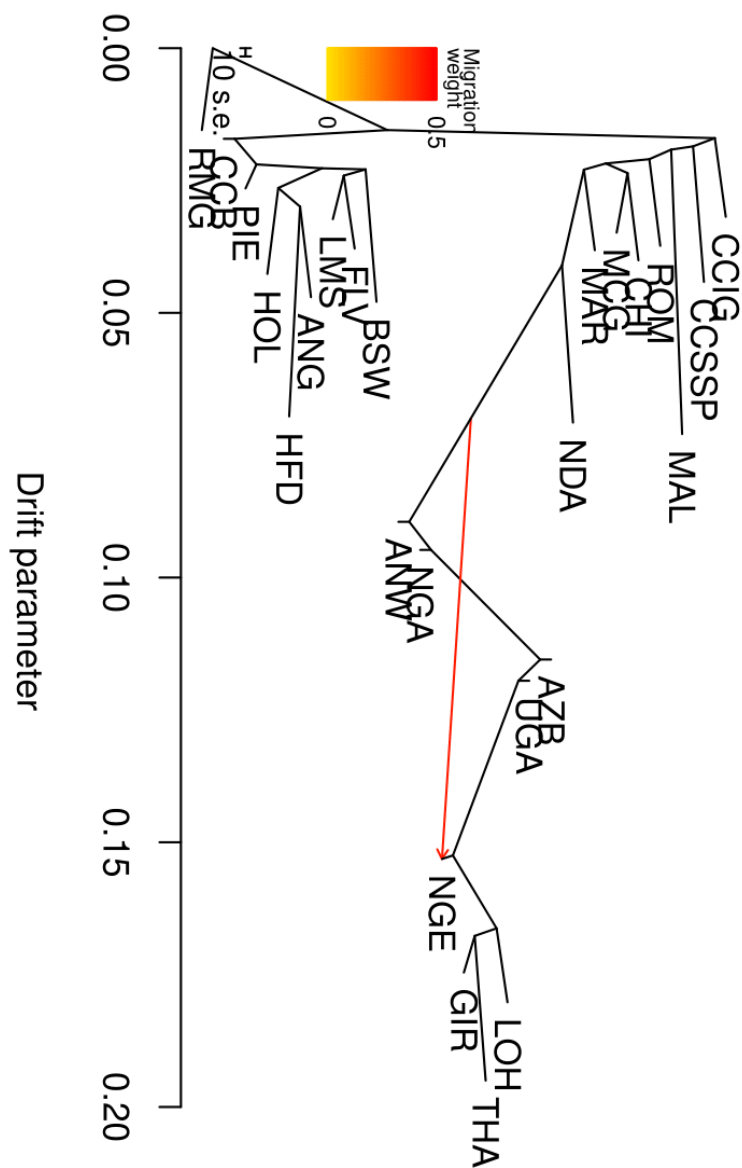
Rezultati su vizualizirani s pomoću StructureSelector softvera (Li i Liu 2017.). Rezultati prikazani na slici 5.5.1, daju uvid u jasnu diferencijaciju između pasmina čak i pri maloj veličini  $K$ . Kod  $K = 2$  odmah se može uočiti izdvajanje slavonsko- srijemskog podolca kad samostalne pasmine. Senczuk i sur. (2021.) dobivaju slične rezultate u analizi svojih goveda, gdje se njima u STRUCTURE analizi prilikom  $K = 2$  također nalaze podolci, od kojih je jedan i slavonsko-srijemski, izdvajaju kao pasmine. Povijesna pripadnost i nastanak podolca kao pasmine daje najbolje objašnjenje zašto se on u svim do sada provedenim analizama, izdvaja kao zasebna pasmina. Istarsko govedo kao pasmina se izdvaja pri  $K = 3$ , dok buša u tome klasteru prikazuje određenu razinu primjese s ostalim pasminama. Klaster sa svim prisutnim pasminama ( $K = 12$ ) daje uvid u primjesu hrvatskih pasmina. STRUCTURE softver iznimno dobro predviđa razine primjese i pasminsku pripadnost individua. Promotrena slika 5-4. prikazuje da je između svih hrvatskih pasmina, buša upravo ta koja ima najveće razine primjese (engl. admixture). Nešto niže razine primjese mogu se primijetiti kod istarskog goveda i slavonsko-srijemskog podolca, no te razine nisu dovoljno velike da bi dovele u pitanje identitet pasmine. Slavonsko-srijemski podolac prikazuje male razine primjese s romanian grey pasminom (RMG-zeleno) i istarskim govedom (CCIG), dok istarsko govedo prikazuje miješanje s talijanskim pasmina maremmana (MAR) i marchigiana (MCG), te nešto malo s bušom (CCB). Između hrvatskih pasmina kod buše se najviše provodio uzgojno-seleksijski plan i oplemenjivanje, čiji je cilj bio unaprijediti proizvodna svojstva pasmine, što je rezultiralo većim razinama primjese unutar pasmine buše.

## 5.6. Migracije gena

Najoptimalniji broj migracija, koju je procijenio paket optM, je jedna migracija na sve pasmine korištene u ovome radu. Delta m pri broju migracija jedan je tada bio najveći, a iznosio je 8.68 (graf 5-9.). Rezultati analize ukazuju na to da nema migracije gena između hrvatskih ili lokalnih pasmina te da se migracija događa između afričkih pasmina. Buša se na slici 5-5. grupirala sa ostalim europskim pasminama. Istarsko govedo i slavonsko-srijemski podolac zajedno se grupiraju s ostalim talijanskim govedima u tipu podolca. Jedna jedina migracija zapažena je na putanji između ndame (NDA) i sokoto gualdi (NGE). Također, boja strelice označava vjerojatnost te migracije crvenom bojom, pa se iz prikazanog može zaključiti da je vjerojatnost vrlo velika (0.5). Može se uočiti da se NGE formirao u blizini indijskih pasmina (LOH, THA, GIR), što daje naslutiti da je prilikom formiranja te pasmine dolazilo do križanja sa zebu govedima. Sokoto gualdi svojim vanjštinom izričito podsjeća na zebu govedo (velika plahtica, masne zalihe na grebenu), a pregledom literature doznajemo da su u formaciji pasmine korištena indo-pakistanska zebu goveda (Hanotte i sur. 200). Pasma se također uzgaja pretežno u centralnoj te zapadnoj Africi što se podudara s područjima uzgoja ndame (NDA). Geografsko preklapanje tih dviju pasmina može biti objašnjeno pojavom migracija gena između pasmina.



Graf 5-9. Optimalni broj migracija.



Slika 5-5. Maximum likelihood stablo izvedeno iz 25 populacija goveda s događajem migracije.

(ANG-Angus, ANW-Ankole-Watussi, AZB-Afrički zebu, BSW-Smeđe govedo, CCB-Buša, CCSSP-Slavonsko-srijemski podolac, CCIG-Istarsko govedo, CHI-Chianina, FLV-Flechviech, GIR-Gir, HFD-Hereford, HOL-Holstein, LMS-Limousin, LOH-Lohari, MCG-Merchigiana, NDA-N'dama, NGA-Nganda, NGE-Sokoto gualdi, PIE-Piedmontese, ROM-Romagnola, THA-Tharparkar, UGA-Karamojong zebu)

## 6. Rasprava

Molekularni markeri kao što su polimorfizmi jednog nukleotida (SNP) ključni su izvor informacija i varijabilnosti u proučavanju parametara genetske varijabilnosti, introgresije i interakcija pasmina goveda. Razvijanjem novih alata i tehnologija otkrivanje polimorfizama je sve jednostavnije i jeftinije. SNP-ovi su jedni od najzastupljenijih genetskih markera pa se često koriste u analizama populacijske i konzervacije genetike. Rezultati analize genetske varijabilnosti te introgresije provedena na hrvatskim pasminama goveda donose vrijedne uvide u njihovu genetsku strukturu. Na temelju pripravljenog data seta, koji se sastoji od tri hrvatske pasmine, dvanaest europskih pasmina, šest afričkih te tri indijske procijenjeni su parametri genetske raznolikosti, koeficijenti inbridinga, analize strukture populacija to analize protoka gena. Analizama genetske raznolikosti procjenjene su razine promotrene i očekivane homozigotnosti, vrijednosti Fis-a te alelna bogatstvo i privatni broj alela. Rezultati analize procjene koeficijenta inbridinga putem ROH segmenata pokazali su da razine inbridinga u hrvatskim pasminama goveda ne prelaze granicu od 5 %. Rezultati analize sličnosti između populacija pokazuju određenu razinu sličnosti između populacija goveda. Također, da se primijetiti da su istarsko govedo i buša sličnije jedna drugoj nego što su sa slavonsko-srijemskim podolcem. Najviše vrijednosti Fst-a hrvatske pasmine imale su s indijskom pasminom gir. Analize glavnih komponenti vizualizirane su na dvodimenzionalnom prostoru, stvaranje klastera pasmina po kontinentima. Tako da su se europske pasmine grupirale zajedno, a zapaženo je i preklapanje određenih pasmina. Analize glavnih komponenti vrlo dobro prikazuju geografske razlike između pasmina, pa je u rezultatima vidljivo odvajanje ndame (NDA) i hereforda (HFD) od ostatka klastera kontinenata. Analize neighbor-net mreže prikazane preko p distanci između svih individua i nei distanci između svih pasmina prikazuju slične rezultate kao i analize glavnih komponenti. Formirale su se tri grupacije pasmina po kontinentima. Buša i istarsko govedo ponovno se nalazu u blizini jedno pored drugog, dok se slavonsko-srijemski podolac grupira zasebno. Ponovno se daju primjetiti razlike u pasminama zbog geografskih udaljenosti, što se na mreži prikazalo kao odvajanje pasmina poput ndame (NDA), hereforda (HFD) i maltese (MAL). Analize provedene s pomoću STRUCTURE softvera daju uvid u strukturu unutar populacija, procjenu primjese populacija i pripadnost individualnih jedinke određenoj populaciji. Najznačajnija promjena u  $\ln Pr(G|K)$  između uzastopnih vrijednosti K bila je na  $K=5$  te je onda on prihvaćen kao najprikladnija vrijednost za ovaj skup podataka. Također, prikazani su rezultati za  $K = 2$ ,  $K = 3$  i  $K = 12$ . Kod prikaza

rezultata za  $K = 2$  primjetno je izdvajanje slavonsko-srijemskoga podolca kao individualne pasmine koja se razlikuje od ostatka europskih pasmina. Istarsko govedo izdvojilo se kao zasebna pasmina kod prikaza  $K = 3$ . Buša u rezultatima za  $K = 3$ ,  $K = 5$  i  $K = 12$  pokazuje veliku razinu miješanja s ostalim pasminama. Analize protoka gena utvrdile su da između hrvatskih i okolnih pasmina nije dolazilo do migracije gena.

## 7. Zaključak

Na temelju pregleda literature te rezultata analiza provedenih na uzorku od 674 goveda i 439 608 SNP-ova, od kojih su 112 hrvatski uzorci, doneseni su zaključci. Molekularni markeri poput SNP-ova predstavljaju vrlo važan alat u analizama koje proučavaju konzervacijska i populacijska genetika, zbog velike količine informacija koje oni sadržavaju. Napredak tehnologije omogućuje brže i jednostavnije prikupljanje podataka koji sadrže SNP-ovi. Analize korištene u ovome radu daju uvid u genetske parametre goveda, kvantificiraju i vizualiziraju sličnosti između populacija i određuju miješanje istih. Genetski parametri procijenjeni u ovome radu, kao što su heterozigotnosti, Fis i inbriding, iznimno su bitni za očuvanje pasmina, kao izvor izravnih informacija genetskih promjena unutar populacije. Parametri nam kao takvi često služe u provedbi konzervacija pasmina. Analize genetske sličnosti ukazuje na sličnosti između populacija goveda, a sugerira nam da su buša i istarsko govedo sličniji jedno drugome nego što su sa slavonsko-srijemskim podolcem. Analize glavnih komponenti (PCA) i neighbor-net mreže daju na uvid formiranje pasmina u klastere po kontinentima. Također, prikazuju geografske razlike između pasmina na istim kontinentima. Strukture populacije analizirana u ovome radu sugeriraju odvajanje slavonsko-srijemskoga podolca već pri malom K ( $K = 2$ ). Istarsko govedo pri  $K = 12$  pokazuje određenu razinu primjese s bliskim talijanskim pasminama, međutim istarsko govedo se izdvojilo kao zasebna pasmina pošto te razine nisu dovoljno velike da dovedu u upit integritet pasmine. Analize migracije gena nisu utvrdile migracijske događaje između hrvatskih pasmina goveda, niti međusobno niti s lokalnim pasminama. Međutim, analizu bi trebalo ponoviti na manjem setu podataka samo lokalnih pasmina kako bi se ta hipoteza potvrdila.

Hrvatske pasmine goveda su pasmine koje su se često koristile u prošlosti, bilo kao radna snaga ili kao izvor prehrambenih namirnica. Modernizacija poljoprivrednih tehnologija i uvođenje uzgojno-seleksijskog rada na komercijalnim pasminama doveli su do smanjenja korištenja hrvatskih pasmina goveda. Ovaj rad je utvrdio bogatu genetsku lepezu koju posjeduju hrvatske pasmine goveda. Pasmine su se pokazale specifičnima i izdvojile su se od ostalih pasmina korištenih u ovom istraživanju. Hrvatske pasmine goveda predstavljaju rezervoar genetske varijabilnosti, koja je danas narušena zbog moderne poljoprivredne prakse. Ovo istraživanje naglašava važnost genetske raznolikosti goveda u Hrvatskoj za očuvanje autohtonih pasmina. Očuvanje genetske raznolikosti ključno je za zdrava stada, otpornost na bolesti te buduće seleksijske programe i uzgoj. Ovaj rad daje informacije za buduće napore u

analizi genetske raznolikosti i introgresije hrvatskih i susjednih pasmina. Daljnja istraživanja genetske strukture hrvatskih pasmina goveda mogu pružiti dublje uvide u genetsku povijest goveda na ovom području.



## 8. Literatura

1. Albrechtsen A., Nielsen F. C. Nielsen R. (2010). Ascertainment Biases in SNP Chips Affect Measures of Population Divergence. *Molecular Biology and Evolution*, 27(11), 2534–2547. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSQ148>
2. Bahbahani H., Afana A., Wragg D. (2018). Genomic signatures of adaptive introgression and environmental adaptation in the Sheko cattle of southwest Ethiopia. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202479>
3. Balaesque P., Poulet N., Cussat-Blanc S., Gerard P., Quintana-Murci L., Heyer E., Jobling M. A. (2015). Y-chromosome descent clusters and male differential reproductive success: young lineage expansions dominate Asian pastoral nomadic populations. *European Journal of Human Genetics* 2015 23:10, 23(10), 1413–1422. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.285>
4. Baltata Romaneasca Cattle | Oklahoma State University. (n.d.). Retrieved July 10, 2024, from <https://breeds.okstate.edu/cattle/baltata-romaneasca-cattle.html?Forwarded=afs.okstate.edu/breeds/cattle/baltataromaneasca/index.html/#content>
5. Barbato M., Hailer F., Upadhyay M., Del Corvo M., Colli L., Negrini R., Kim E. S., Crooijmans R. P. M. A., Sonstegard T., Ajmone-Marsan, P. (2020). Adaptive introgression from indicine cattle into white cattle breeds from Central Italy. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57880-4>
6. Bartosiewicz L. (2013). Animals in Bronze Age Europe. *The Oxford Handbook of the European Bronze Age*, 328-347
7. Barker J. S. F. (2011). Conservation and management of genetic diversity: a domestic animal perspective. 31(4), 588–595. <https://doi.org/10.1139/X00-180>

8. Battey C. J., Coffing G. C., Kern A. D. (2020). Visualizing Population Structure with Variational Autoencoders. *BioRxiv*, 2020.08.12.248278. <https://doi.org/10.1101/2020.08.12.248278>
9. Bertolini F., Galimberti G., Calò D. G., Schiavo G., Matassino D., Fontanesi L. (2015). Combined use of principal component analysis and random forests identify population-informative single nucleotide polymorphisms: application in cattle breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 132(5), 346–356. <https://doi.org/10.1111/JBG.12155>
10. Bessong W. O. (2023). Improving Bovine Productivity in Central Africa: The case of Goudali Zebu Cattle under Ranching Conditions in Western Highland Sudan-Savannah of Cameroon. <https://air.uniud.it/handle/11390/1132819>
11. Bhardwaj S., Singh S., Ganguly I., Bhatia A. K., Bharti V. K., Dixit S. P. (2021). Genome-wide diversity analysis for signatures of selection of *Bos indicus* adaptability under extreme agro-climatic conditions of temperate and tropical ecosystems. *Animal Gene*, 20, 200115. <https://doi.org/10.1016/J.ANGEN.2021.200115>
12. Biscarini F., Schwarzenbacher H., Pausch H., Nicolazzi E. L., Pirola Y., Biffani S. (2016). Use of SNP genotypes to identify carriers of harmful recessive mutations in cattle populations. *BMC Genomics*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12864-016-3218-9/FIGURES/7>
13. Blott S. C., Williams J. L., Haley C. S. (1998). Genetic relationships among European cattle breeds. *Animal Genetics*, 29(4), 273–282. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2052.1998.00327.X>
14. Bradley, D. G., Loftus R. T., Cunningham P., Machugh D. E. (1998). Genetics and Domestic Cattle Origins. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6505\(1998\)6:3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6505(1998)6:3)
15. Brinzej R., Rastija T. (1974): Slavonsko podolsko govedo. *Stočarstvo* 29, 119-125

16. Caput, P., Ivanković, A., & Mioč, B. (2010). Očuvanje biološke raznolikosti u stočarstvu. *Hrvastka mljekarska udruga*, 216-224
17. Cartwright S. L. Schmied J., Karrow N., Mallard B. A. (2023). Impact of heat stress on dairy cattle and selection strategies for thermotolerance: a review. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1198697. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1198697/BIBTEX>
18. Clutton-Brock J. (1992). The process of domestication. *Mammal Review*, 22(2), 79–85. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2907.1992.TB00122.X>
19. Coombs J. A., Letcher B. H., Nislow K. H. (2012). GONE: Software for estimating effective population size in species with generational overlap. *Molecular Ecology Resources*, 12(1), 160–163. <https://doi.org/10.1111/J.1755-0998.2011.03057.X>
20. 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 Genetics*, 10(3), e1004254. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004254>
21. Delaneau O., Howie B., Cox A. J., Zagury J. F., Marchini J. (2013). Haplotype estimation using sequencing reads. *American Journal of Human Genetics*, 93(4), 687–696. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.002>
22. Edea Z, Bhuiyan MSA, Dessie T, Rothschild MF, Dadi H, Kim KS. (2015.) Genome-wide genetic diversity, population structure and admixture analysis in African and Asian cattle breeds. *Animal*. ;9(2):218-226. doi:10.1017/S1751731114002560

23. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2005.02553.X>
24. FAO (2024). Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT statistical database. <https://www.fao.org/dad-is/dataexport/en/> (pristupljeno 13.travnja.2024.)
25. Felius M., Beerling M. L., Buchanan D. S., Theunissen B., Koolmees P. A., Lenstra J. A. (2014). On the History of Cattle Genetic Resources. *Diversity* 2014, Vol. 6, Pages 705-750, 6(4), 705–750. <https://doi.org/10.3390/D6040705>
26. Forutan M., Ansari Mahyari S., Baes C., Melzer N., Schenkel F. S., Sargolzaei M. (2018). Inbreeding and runs of homozygosity before and after genomic selection in North American Holstein cattle. *BMC Genomics*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12864-018-4453-Z/FIGURES/6>
27. Freitas P. H. F., Wang Y., Yan P., Oliveira H. R., Schenkel F. S., Zhang Y., Xu Q., Brito L. F. (2021). Genetic Diversity and Signatures of Selection for Thermal Stress in Cattle and Other Two Bos Species Adapted to Divergent Climatic Conditions. *Frontiers in Genetics*, 12, 604823. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.604823/BIBTEX>
28. Friedrich J., Bailey R. I., Talenti A., Chaudhry U., Ali Q., Obishakin E. F., Ezeasor C., Powell J., Hanotte O., Tijjani A., Marshall K., Prendergast J., Wiener P. (2023). Mapping restricted introgression across the genomes of admixed indigenous African cattle breeds. <https://doi.org/10.1186/s12711-023-00861-8>
29. Ginja C., Lui L., Telo L., Gama D. A., Cecilia M., Penedo T. (2010). Analysis of STR Markers Reveals High Genetic Structure in Portuguese Native Cattle. *Journal of Heredity*, 101(2), 201–210. <https://doi.org/10.1093/JHERED/ESP104>
30. Hanotte O. Tawah C.L. Bradley D.G. Okomo M. Verjee Y. Ochieng J. and Rege J.E.O. 2000. Geographic distribution and frequency of a taurine Bos taurus and an

indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-Saharan African cattle breeds. *Molecular Ecology*.9(4):387-396.

31. 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. <https://doi.org/10.1101/gr.387103>.
32. Hill W. G., Mackay T. F. C. (2004). D. S. Falconer and Introduction to Quantitative Genetics. *Genetics*, 167(4), 1529–1536. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/167.4.1529>
33. Huson D.H. i Bryant D. (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Mol. Biol. Evol.*, 23(2):254-267
34. Durham E., Vigne J.-Denis., Peters Joris., Helmer Daniel. (2005). The first steps of animal domestication: new archaeozoological approaches. 176. [https://www.researchgate.net/publication/334696954\\_Identifying\\_early\\_domestic\\_cattle\\_from\\_Pre-Pottery\\_Neolithic\\_sites\\_on\\_the\\_Middle\\_Euphrates\\_using\\_sexual\\_dimorphism](https://www.researchgate.net/publication/334696954_Identifying_early_domestic_cattle_from_Pre-Pottery_Neolithic_sites_on_the_Middle_Euphrates_using_sexual_dimorphism)
35. Ivanković A., Kelava N., Konjačić M., Caput P., Ramljak J. (2006.). Odlike vanjštine istarskoga goveda. *Stočarstvo* 60, 243-257
36. Jolliffe I. (2005). Principal Component Analysis. *Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science*. <https://doi.org/10.1002/0470013192.BSA501>
37. Kantanen J., Olsaker I., Holm L. E., Lien S., Vilkki J., Brusgaard K., Eythorsdottir E., Danell B., Adalsteinsson S. (2000). Genetic diversity and population structure of 20 north European cattle breeds. *Journal of Heredity*, 91(6), 446–457. <https://doi.org/10.1093/JHERED/91.6.446>
38. Kelleher M. M., Berry D. P., Kearney J. F., McParland S., Buckley F., Purfield D. C. (2017). Inference of population structure of purebred dairy and beef cattle using

- high-density genotype data. *Animal*, 11(1), 15–23.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731116001099>
39. Konjačić M., Ivanković A., Caput P., Mijić P., Pranić D., (2004.): Buša u Hrvatskoj. *Stočarstvo* 58, 163-177.
40. Leberg P. L. (2002). Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology*, 11(11), 2445–2449.  
<https://doi.org/10.1046/J.1365-294X.2002.01612.X>
41. Lehnert K., Ward H., Berry S. D., Ankersmit-Udy A., Burrett A., Beattie E. M., Thomas N. L., Harris B., Ford C. A., Browning S. R., Rawson P., Verkerk G. A., Van Der Does Y., Adams L. F., Davis S. R., Jordan T. W., Macgibbon A. K. H., Spelman R. J., Snell R. G. (2015). Phenotypic population screen identifies a new mutation in bovine DGAT1 responsible for unsaturated milk fat. *Scientific Reports* 2015 5:1, 5(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep08484>
42. Li Y. L., Liu J. X. (2018). StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, 18(1), 176–177. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12719>
43. Lwin, M., Mon S. L. Y., Yamanak, H., Nagano Y., Mannen H., Faruque M. O., Kawabe K., Okamoto S., Shimogiri T. (2018). Genetic diversities and population structures of four popular Myanmar local cattle breeds. *Animal Science Journal*, 89(12), 1648–1655. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13112>
44. MacKinnon M. R. (2004). Production and consumption of animals in Roman Italy: integrating the zooarchaeological and textual evidence.
45. Mahadevan P., Marples H. J. S. (1961). An analysis of the Entebbe herd of Nganda cattle in Uganda. *Animal Production*, 3(1), 29–39.  
<https://doi.org/10.1017/S0003356100033742>

46. Makina S. O., Taylor J. F., Van Marle-Köster E., Muchadeyi F. C., Makgahlela M. L., MacNeil M. D., Maiwashe A. (2015). Extent of linkage disequilibrium and effective population size in four South African sanga cattle breeds. *Frontiers in Genetics*, 6(DEC), 164508. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2015.00337/BIBTEX>
47. Maretto F., Ramljak J., Sbarra F., Penasa M., Mantovani R., Ivanković A., Bittante G. (2012). Genetic relationships among Italian and Croatian Podolian cattle breeds assessed by microsatellite markers. *Livestock Science*, 150(1–3), 256–264. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2012.09.011>
48. Margolin S., Bartlet J. W. (1945). The Influence of Inbreeding upon the Weight and Size of Dairy Cattle. *Journal of Animal Science*, 4(1), 3–12. <https://doi.org/10.2527/JAS1945.0413>
49. McKay S. D., Schnabel R. D., Murdoch B. M., Matukumalli L. K., Aerts J., Coppieters W., Crews D., Neto E. D., Gill C. A., Gao C., Mannen H., Wang Z., Van Tassell C. P., Williams J. L., Taylor J. F., Moore S. S. (2008). An assessment of population structure in eight breeds of cattle using a whole genome SNP panel. *BMC Genetics*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-37/TABLES/2>
50. Medugorac I., Medugorac A., Russ I., Veit-Kensch C. E., Taberlet P., Luntz B., Mix H. M., Förster M. (2009). Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size. *Molecular Ecology*, 18(16), 3394–3410. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2009.04286.X>
51. Medugora, I., Medjugorac A., Russ I., Veit-Kensch C. E., Luntz B., Förster M., Blum H. (2011). Genetic diversity of European local cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size. *Molecular Ecology*
52. Meseret S., Mekonnen Y. A., Brenig B., Schütz E., Hanotte O., Gültas M., Schmitt A. O. (2020). Genetic diversity and population structure of six ethiopian cattle

- breeds from different geographical regions using high density single nucleotide polymorphisms. *Livestock Science*, 234, 103979. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2020.103979>
53. Miliskauskas S. (2002): *European Prehistory: A Survey*. Interdisciplinary Contributions to Archaeology. Springer
54. MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE (2021). Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021. – 2025. Zagreb
55. Naderi S., Bohlouli M., Yin, T., & König S. (2018). Genomic breeding values, SNP effects and gene identification for disease traits in cow training sets. *Animal Genetics*, 49(3), 178–192. <https://doi.org/10.1111/AGE.12661>
56. Naserkheil M., Miraie-Ashtiani S. R., Sadeghi M., Nejati-Javaremi A., Park C. W., Min K. S., Lee D. (2019). Exploring novel single nucleotide polymorphisms and haplotypes of the diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) gene and their effects on protein structure in Iranian buffalo. *Genes and Genomics*, 41(11), 1265–1271. <https://doi.org/10.1007/S13258-019-00854-2/TABLES/5>
57. Neupane M., Kiser J. N., Neiberghs H. L. (2018). Gene set enrichment analysis of SNP data in dairy and beef cattle with bovine respiratory disease. *Animal Genetics*, 49(6), 527–538. <https://doi.org/10.1111/AGE.12718>
58. Nielsen R. (2004). Population genetic analysis of ascertained SNP data. *Hum Genomics* 1, 218 <https://doi.org/10.1186/1479-7364-1-3-218>
59. Nosrati M., Asadollahpour Nanaei H., Javanmard A., Esmailizadeh A. (2021). The pattern of runs of homozygosity and genomic inbreeding in world-wide sheep populations. *Genomics*, 113(3), 1407–1415. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2021.03.005>



60. Orozco-terWengel P., Barbato M., Nicolazzi E., Biscarini F., Milanesi M., Davies W., Williams D., Stella A., Ajmone-Marsan P., Bruford M. W. (2015). Revisiting demographic processes in cattle with genome-wide population genetic analysis. *Frontiers in Genetics*, 6(JUN), 138094. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2015.00191/ABSTRACT>
61. Orozco-terWengel P., Barbato M., Nicolazzi E., Biscarini F., Milanesi M., Davies W., Williams D., Stella A., Ajmone-Marsan P., Bruford M. W. (2015). Revisiting demographic processes in cattle with genome-wide population genetic analysis. *Frontiers in Genetics*, 6(JUN), 138094. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2015.00191/ABSTRACT>
62. O'Sullivan A. McCormick F., Kerr T., & Harney L. (2010). Early Medieval Ireland: Archaeological Excavations 1930-2009-Text for Royal Irish Academy (No. Early Medieval Archaeology Project (EMAP) Report 4.5). Early Medieval Archaeology Project (EMAP), UCD School of Archaeology, and School of Geography Archaeology and Palaeoecology, Queens University Belfast.
63. Pickrell J.K., Pritchard J.K. (2012). Inference of population splits and mixtures from genome-wide allele frequency data. *PLoS Genetics*.
64. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., De Bakker P.I., Daly M.J., Sham P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American journal of human genetics*, 81(3), pp.559-575..
65. Park S. D. E., Magee D. A., McGettigan P. A., Teasdale M. D., Edwards C. J., Lohan A. J., Murphy A., Braud M., Donoghue M. T., Liu Y., Chamberlain A. T., Rue-Albrecht K., Schroeder S., Spillane C., Tai S., Bradley D. G., Sonstegard T. S., Loftus B. J., MacHugh D. E. (2015). Genome sequencing of the extinct Eurasian wild aurochs, *Bos primigenius*, illuminates the phylogeography and evolution of cattle. *Genome Biology*, 16(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13059-015-0790-2/FIGURES/6>

66. Pérez O'Brien A. M., Mészáros G., Utsunomiya Y. T., Sonstegard T. S., Garcia J. F., Van Tassell C. P., Carneiro R., da Silva M. V. B., Sölkner J. (2014). Linkage disequilibrium levels in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle using medium and high density SNP chip data and different minor allele frequency distributions. *Livestock Science*, 166(1), 121–132. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2014.05.007>
67. Peripolli E., Stafuzza N. B., Munari D. P., Lima A. L. F., Irgang R., Machado M. A., Panetto J. C. do C., Ventura R. V., Baldi F., da Silva M. V. G. B. (2018). Assessment of runs of homozygosity islands and estimates of genomic inbreeding in Gyr (*Bos indicus*) dairy cattle. *BMC Genomics*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12864-017-4365-3/FIGURES/5>
68. Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/155.2.945>
69. R Core Team (2023). A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
70. 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. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAA169>
71. Schefers J. M., Weige K. A. (2012). Genomic selection in dairy cattle: Integration of DNA testing into breeding programs. *Animal Frontiers*, 2(1), 4–9. <https://doi.org/10.2527/AF.2011-0032>
72. Senczuk G., Mastrangelo S., Ajmone-Marsan P., Becskei Z., Colangelo P., Colli L., Ferretti L., Karsli T., Lancioni H., Lasagna E., Marletta D., Persichilli C., Portolano B., Sarti F. M., Ciani E., Pilla F. (2021). On the origin and diversification of Podolian cattle breeds: testing scenarios of European colonization using

- genome-wide SNP data. *Genetics Selection Evolution*, 53(1), 1–16.  
<https://doi.org/10.1186/S12711-021-00639-W/TABLES/2>
73. Sermyagin A. A., Dotsev A. V., Gladyr E. A., Traspov A. A., Deniskova T. E., Kostyunina O. V., Reyer H., Wimmers K., Barbato M., Paronyan I. A., Plemyashov K. V., Sölkner J., Popov R. G., Brem G., Zinovieva N. A. (2018). Whole-genome SNP analysis elucidates the genetic structure of Russian cattle and its relationship with Eurasian taurine breeds. *Genetics Selection Evolution*, 50(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12711-018-0408-8/FIGURES/5>
74. Stock F., & Gifford-Gonzalez D. (2013). Genetics and African Cattle Domestication. *African Archaeological Review*, 30(1), 51–72. <https://doi.org/10.1007/S10437-013-9131-6/FIGURES/1>
75. Troy C. S., MacHugh D. E., Bailey J. F., Magee D. A., Loftus R. T., Cunningham P., Chamberlain, A. T., Sykes B. C., Bradley D. G. (2001). Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 2001 410:6832, 410(6832), 1088–1091. <https://doi.org/10.1038/35074088>
76. Upadhyay M. R., Chen W., Lenstra J. A., Goderie C. R. J., Machugh D. E., Park S. D. E., Magee D. A., Matassino D., Ciani F., Megens H. J., Van Arendonk J. A. M. Groenen, M. A. M., Marsan P. A., Balteanu V., Dunner S., Garcia J. F., Ginja C., Kantanen J. (2016). Genetic origin, admixture and population history of aurochs (*Bos primigenius*) and primitive European cattle. *Heredity* 2017 118:2, 118(2), 169–176. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.79>
77. Upadhyay M., Bortoluzzi C., Barbato M., Ajmone-Marsan P., Colli L., Ginja, C., Sonstegard T. S., Bosse M., Lenstra J. A., Groenen M. A. M., Crooijmans R. P. M. A. (2019). Deciphering the patterns of genetic admixture and diversity in southern European cattle using genome-wide SNPs. *Evolutionary Applications*, 12(5), 951–963. <https://doi.org/10.1111/EVA.12770>
78. Weir B. S., Hill W. G. (2002). Estimating F-statistics. *Annual Review of Genetics*, 36(Volume 36, 2002), 721–750.

<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.36.050802.093940/CITE/REFWORS>  
[KS](#)

79. Wright S. (1931). Evolution in Mendelian Populations. *Genetics*, 16(3), 290. [/pmc/articles/PMC1201098/](#)
80. Zinovieva N. A., Sheiko I. P., Dotsev A. V., Sheiko R. I., Mikhailova M. E., Sermyagin A. A., Abdelmanova A. S., Kharzinova V. R., Reyer H., Wimmers, K., Sölkner J., Pleshanov N. V., Brem G. (2021). Genome-wide SNP analysis clearly distinguished the Belarusian Red cattle from other European cattle breeds. *Animal Genetics*, 52(5), 720–724. <https://doi.org/10.1111/AGE.13102>