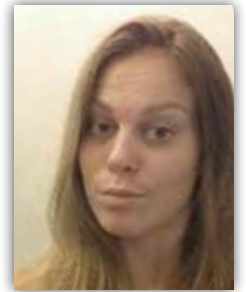


Istraživanje prisutnosti konja u tipu dalmatinskog bušaka na području Dalmacije

Investigation of the Dalmatian *bušak* horse type in Dalmatia

Listeš, E.^{1*}, K. Starčević², K. Severin², M. Cotman³, Lj. Barbić⁴, M. Maurić⁵



Sažetak

Očuvanje genske raznolikosti domaćih životinja bitan je segment u razvoju moderne poljoprivredne prakse koji stavlja naglasak na očuvanje autohtonih domaćih pasmina životinja, a samim time i očuvanje bioraznolikosti u svijetu. Jedna od potencijalnih autohtonih pasmina na području Republike Hrvatske, koja je prema *Zelenoj knjizi izvornih pasmina Hrvatske* svrstana u izumrlu i nedovoljno poznate, jest dalmatinski bušak. O navedenoj populaciji nema mnogo podataka, a i oni postojeći vezani su samo uz morfološki opis konja te njegove mjere. S obzirom na to da u Dalmaciji još uvijek postoje konji koji svojom konformacijskom građom odgovaraju potencijalnoj pasmini dalmatinski bušak, cilj ovog istraživanja bio je opisati gensku raznolikost tih životinja. Također, napravljene su i izmjere konja te su uspoređene s literaturnim podacima, no zbog malog broja izmjerenih životinja (2) nije moguća pouzdana usporedba. Molekularno-genetskim metodama određena je raznolikost mikrosatelitskih lokusa što bi omogućilo daljnji opis populacije. Istraživanje je provedeno na šest konja (2 mužjaka i 4 ženke) starosne dobi od 2,5 do 3,5 godina. Od 17 istraživanih lokusa, 16 je polimorfno, a jedan monomorfan. Prosječna opažena heterozigotnost (H_0) iznosi 0,7, a očekivana (H_e) 0,6 te je stoga fiksacijski indeks (F_{IS}) negativan. Prosječan informacijski sadržaj polimorfizma (PIC), kao i za većinu lokusa zasebno, upućuje na visokoinformativne marke. Raspon frekvencija alela u svih 17 lokusa kretao se od 8,3% do 100%. Usprkos malom uzorku svi su promatrani lokusi bili u genskoj ravnoteži prema Hardy-Weinbergovu zakonu. S obzirom na prikupljene rezultate te na mali broj obrađenih jedinki, ovaj je rad početak istraživanja kojim bi se započeo daljnji rad s ciljem opisivanja i očuvanja ove potencijalne autohtone pasmine.

¹ Ema Listeš, studentica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
² dr. sc. Kristina Starčević, izv. prof. dr. sc. Krešimir Severin, Zavod za sudsko i upravno veterinarstvo, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
³ dr. Marko Cotman, Institut za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija
⁴ izv. prof. dr. sc. Ljubo Barbić, Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
⁵ doc. dr. sc. Maja Maurić, Zavod za uzgoj životinja i stočarsku proizvodnju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
 *e-mail: emalistes19@gmail.com

Abstract

In order to preserve global biodiversity and a larger genetic pool, a great deal of effort is being invested in the conservation of local indigenous domestic animal breeds. One of the potential Croatian indigenous breeds, according to the „Green book of indigenous breeds of Croatia“, classified as extinct or unknown, is the Dalmatian *bušak*. Not much data are available about this population, where all that is available is a morphological description and the measurements of the horse. Since in Dalmatia there still is a small population of horses that in terms of their physical characteristics correspond to the Dalmatian *bušak*, the aim of the study was to measure these horses and compare them to the literature data. Unfortunately, because of the small number of horses measured (2), a reliable comparison was not possible. Also, microsatellite genetic markers were used for further characterization and description of the population. In total six horses (2 males and 4 females), aged from 2.5 to 3.5 years, were included in the study. Of the 17 loci investigated, 16 were polymorphic and one monomorphic. The average observed heterozygosity (H_0) was 0.7 and expected heterozy-

Ključne riječi: dalmatinski bušak, autohtone pasmine, bioraznolikost, mikrosateliti

Key words: Dalmatian bušak, indigenous breeds, biodiversity, microsatellites

gosity (HE) was 0.6. Consequently, the fixation index (FIS) was negative. The average polymorphism information content (PIC), as well as that of most loci separately, was highly informative. The frequency range of all 17 loci was from 8.3% to 100%. Despite the small sample, all observed loci were in genetic equilibrium according to the Hardy–Weinberg law. Regardless of the small number of animals used, given the results obtained, this research presents the beginning of a study with the goal of preserving this potentially indigenous breed.

UVOD

U očuvanju biološke raznolikosti domaćih životinja bitan se naglasak stavlja na očuvanje i sprečavanje izumiranja autohtonih pasmina životinja, posebice lokalnih populacija domaćih životinja za koje još nije utvrđen (u potpunosti definiran) njihov status (Galov i sur., 2005.; Barać i sur., 2011.; Galov i sur., 2013.). Sve je veća opasnost izumiranja tih rijetkih lokalnih populacija, a zajedno s njima i njihovog lokalno prilagođenog genetskog fonda (Galov i sur., 2005.).

Jedna od potencijalnih hrvatskih autohtonih pasmina konja koja pripada u neocijenjene prema kategorizaciji FAO-a (engl. *Food and Agriculture Organization*), a svrstana je u izumrle i nedovoljno poznate u *Zelenoj knjizi izvornih pasmina Hrvatske* (Barać i sur., 2011.), jest dalmatinski bušak, poznat još pod imenima dalmatinski poni, dalmatinski konj i dalmatinski tovarni konj.

Ime dalmatinskog bušaka prvi se put spominje u izvješću o uzgoju konja na području Austro-Ugarske u razdoblju od 1848. do 1898. godine (Barać i sur., 2011.). U tom izvješću major Hermann Gassebner spominje uzgoj manjih, ali vrlo živahnih konja koji se koriste kao tovarne životinje na području Dalmacije. Sljedeći pisani trag ove populacije jest u *Izvješću o radu Zemaljske gospodarstvene Uprave Kraljevine Hrvatske i Slavonije za razdoblje 1896.-1905.*, gdje populaciju u poglavlju o konjogojstvu spominje prof. dr. Oton Frangeš (Barać i sur., 2011.).

Dalmatinski se bušak koristio kao tovarni konj u mediteranskom dijelu Hrvatske, a najviše za prijevoz grožđa, maslina i žita u primorskim selima na kopnu i otocima (Barać i sur., 2011.). Smatra se da je nastao stoljetnim uzgojem na području mediteranske Hrvatske uz povremenu introdukciju gena arapskog i bosanskog konja te da je na oblikovanje dalmatinskog bušaka u samom početku znatan utjecaj imao rimski poni.

Trenutačno dostupni opisi i mjere dalmatinskog bušaka nalaze se u *Zelenoj knjizi izvornih pasmina Hrvatske* (Barać i sur., 2011.). i u radu Ivankovića i sur. (2012.). Barać i sur. (2011.) citiraju opis i mjere od Ivanković i sur. (2012.) te opis prof. dr. Otona Frangeša iz spomenutog izvješća. Prof. dr. Oton Frangeš opisuje dalmatinskog bušaka kao konja s teškom, mesnatom glavom, kratkim vratom, dugih leđa, velikog trbuha, strmoga stražnjeg dijela, tankih kostiju nogu, žilavih mišića i ligamenata te čvrstih kopita. Raspon visine u grebenu kretao se od 110 do 140 cm (Barać i sur., 2011.). Slično, ali s mnogo više detalja, populaciju su opisali Ivanović i sur. (2012.). Istraživanje navedenih autora provedeno je na području Dubrovačko-neretvanske županije tijekom 2010. godine, na 18 konja (2 pastuha i 16 kobila) starijih od četiri godine. Dalmatinski je bušak opisan kao konj suhe, umjereno velike glave, ravnoga do blago konveksnog profila, kratkih ušiju te živahnih i izražajnih očiju. Posjeduje umjereno dug vrat, nešto tanji u kobila i mišićaviji u pastuha, koji je blagim prijelazom spojen s trupom. Trup je umjereno pravokutna oblika i ima umjereno izražen i dug greben. Leđa su umjereno duga i blago ulegnuta. Sapi dio nije nadgrađen u odnosu na greben. Sapi su umjerene širine i dužine, krovaste, blago ukošene i slabo obrasle mišićjem. Noge su također slabo obrasle snažnim mišićjem, pravilna položaja i snažnih tetiva. Zglobovi su suhi i izražajni, a kopita dobro građena, tvrda i male veličine. Hod je opisan kao ispravan, energičan, impulzivan, elastičan i umjereno izdašan. Dlačni je pokrivač jednobojan s tamno pigmentiranom kožom, a opisani su od svjetlijih do tamnijih dorata te pokoji konj druge boje. Temperament im je miran, ustrajan u radu i prilagodljiv. Visina u grebenu je iznosila 127 cm, dužina trupa 135 cm, opseg prsa 152 cm, a opseg cjevanice 16,6 cm. Zaključak koji je postignut tim radom bio je da, iako prilično sli-

čan bosanskom brdskom konju, populacija ima svoju osobitost te da je potrebno poduzeti mjere njezine zaštite (Ivanković i sur., 2012.).

S obzirom na to da je radi utvrđivanja i očitovanja ovih konja bitno opisati gensku postojećih životinja u tipu dalmatinskog bušaka, cilj našeg istraživanja bio je analizirati mikrosatelitske lokuse jedinki konja u tipu dalmatinskog bušaka. Mikrosateliti su, s obzirom na svoju visoku informativnu vrijednost, najčešće korišteni markeri u istraživanjima biološke raznolikosti stoke i konja (Marletta i sur., 2006.; Druml i sur., 2007.; Mahrous i sur., 2011.).

Međunarodna udruga za animalnu genetiku (engl. *International Society of Animal Genetics*, ISAG) razvila je standardiziranu listu (panel) markera za genetsko profiliranje konja kako bi se različita istraživanja mogla međusobno uspoređivati (Anonymous, 2018.a). Na navedenoj se listi nalazi 20 lokusa. Trenutačno je na tržištu dostupan komercijalni kit StockMarks™ for Horses 17-Plex Genotyping Kit (ThermoFisher Scientific, Finska) koji umnaža 17 od 20 preporučenih lokusa s liste ISAG-a te je stoga on korišten u ovom radu.

MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na 6 konja (2 mužjaka i 4 ženke) koji, temeljem literaturnih navoda i procjene konformacijske građe, odgovaraju opisu dalmatinskog bušaka. Iako istraženi konji u tipu dalmatinskog bušaka pokazuju određenu sličnost s bosansko brdskim konjem, također postoje i odstupanja. Naime, istraživani konji su umjereno pravokutnog formata tijela, za razliku od bosansko brdskog konja čiji je format kvadratičnog oblika (Ivanković i sur., 2012.). Također iz podataka dostupnih u Ivanković i sur. (2012.) i Mesarić i sur. (2015.), visina grebena bosansko brdskog konja kretala se u rasponu od 126,3 cm do 138 cm, dok su visine grebena jedinki (2) iz ovog istraživanja niže od navedenih (Tablica 1.).

Konji su, prema navodu vlasnika, starosne dobi od 2,5 do 3,5 godina. Svih 6 konja nalazi se pašno držano na imanju u Dubrovačko-neretvanskoj županiji.

Tjelesne mjere

Mjerenje jedinki provedeno je Lydtinovima štapićem (preciznost 0,5 cm), vrpce (s preciznošću 0,1 cm) te šestila (preciznost 0,5 cm). Lydti-

Tablica 1. Vrijednosti tjelesnih mjera izmjenog mužjaka i ženke (u cm) te mjere iz literature (Ivanković i sur., 2012.). Mjere iz literature prikazane su kao aritmetička sredina (\bar{X}) ± standardna devijacija (SD).

Mjera	Mužjak	Ženka	Literatura
Visina grebena	122	117	127,2 ± 3,29
Visina križa	124	120	127,9 ± 3,60
Dužina trupa	124,5	121	135,0 ± 3,94
Dubina prsa	64	57	58,8 ± 1,67
Širina prsa	27,5	28	31,8 ± 1,46
Opseg prsa	142,5	144,5	151,7 ± 3,02
Širina sapi	34	39	45,5 ± 2,27
Dužina sapi	40,5	37,5	45,8 ± 2,20
Opseg cjevanice	16	-*	16,65 ± 0,82

*nije bilo moguće izmjeriti zbog nemira jedinke

Slika 1. Pastuh dalmatinskog bušaka star oko tri godine.



novim je štapom mjerena visina grebena (od najviše točke grebena okomito nadolje, slijedeći kosti prednje noge do površine na kojoj konj stoji, sa strane i malo odostraga kopita), visina križa (visina od najvišeg dijela križne kosti okomito do površine na kojoj konj stoji), dužina trupa (od prednje točke lopatično-ramenog zgloba pa do najudaljenije točke sjedne kvrge), dubina prsa (razmak od vrha grebena do najniže točke prsne kosti), šestilom širina prsa (razmak između lijevoga i desnog ramenog zgloba), širina sapi (razmak između lijevoga i desnog lednog grebena crijevne kosti), dužina sapi (od lednog grebena crijevne kosti do najudaljenije točke sjedne kvrge), a vrpcom opseg prsa (oko prsnoga koša, iza lopatice, na najužem mjestu prsnoga koša) i opseg cjevanice (na najtanjem mjestu prednje cjevanice, *metacarpus*, lijeve noge). S obzirom na to da konji nisu ujahani ni naučeni na ikakvu manipulaciju od ljudi, uzimanje mjera bilo je otežano i moguće provesti samo na dvije jedinice (1 mužjak i 1 ženka). Krv konja vađena je venepunkcijom iz jugularne vene u sterilne epruvete s EDTA antikoagulansom.

Izolacija genomske DNK

Izolacija genomske DNK provedena je kitom AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bio-ner, Republika Koreja) prema uputama proizvođača. Prilikom izolacije DNK uzeta je količina od 200 μ L pune krvi. Koncentracija i čistoća dobivene DNK očitana je na spektrofotometru BioDrop μ LITE (BioDrop, Cambridge, UK). Čistoća izdvojene DNK određena je omjerom apsorbancija valnih dužina 260/280 nm, a očitane su vrijednosti bile u preporučenom rasponu 1,8 – 2,0. Nakon toga izolirana je DNK pohranjena u zamrzivaču na -20°C .

Umnažanje mikrosatelitskih markera lančanom reakcijom polimerazom (PCR) i analiza mikrosatelita

Lančanom reakcijom polimerazom umnoženo je 17 mikrosatelitskih lokusa komercijalnim kitom StockMarks™ for Horses 17-Plex Genotyping Kit (ThermoFisher Scientific, Finska) prema uputama proizvođača u uređaju MastercyclerR Personal 5332 (Eppendorf AG, Njemačka). Korišteni lokusi bili su slijedeći: VHL20 (Van Haeringen i sur., 1994.), HTG4, HTG6 (Ellegren i sur., 1992.), AHT4, AHT5 (Binns i sur., 1995.), HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7 (Guerin i sur., 1994.), ASB23 (Irvin i sur., 1998.), ASB2, ASB17 (Breen i sur., 1997.), HTG7, HTG10 (Marklund i sur., 1994.), LEX3 (Coogole i sur., 1996.) i CA425 (Eggleston-Stott i sur., 1997.). Združena PCR reakcija provedena je u ukupnom volumenu od 15 μ L. Osim umnažanja uzoraka također je napravljena po jedna pozitivna i negativna kontrola. Program PCR reakcije započinje grijanjem uzoraka na 95°C tijekom 10 minuta, nakon čega slijedi 30 ciklusa od 95°C tijekom 30 sekundi, 60°C tijekom 30 sekundi i 72°C tijekom 60 sekundi te na kraju 72°C tijekom 60 minuta. Po svakom uzorku 1,5 μ L mikrosatelitskih PCR proizvoda pomiješano je s 10 μ L formaldehida i 0,5 μ L DNA standarda 500 LIZ (Applied Biosystems®). Uzorci su 3 minute denaturirani na 95°C te neposredno nakon toga smješteni na led. Umnoženi su mikrosateliti analizirani kapilarnom elektroforezom uz pomoć automatskog sekvencera ABI Prism 3130 i „Dye set“ Fam, Vic, Ned i Rox. Nakon kapilarne elektroforeze mikrosatelitski fragmenti DNA bili su vidljivi u obliku .fsa datoteka. Pregledavanje .fsa dato-

teka i određivanje mikrosatelitskih alela učinjeno je računalnim programom GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

Statistička obrada podataka

Frekvencije alela, opažena (H_o) i očekivana (H_e) heterozigotnost, provjera ravnoteže učestalosti promatranih alela u skladu s Hardy-Weinbergovim zakonom te vrijednosti fiksacijskog

indeksa (F_{is}) svakog mikrosatelita izračunate su programom POPGENE32, verzija 1.32 (YEH i sur., 2000.). Vrijednost informacijskog sadržaja polimorfizma (PIC) za svaki mikrosatelit dobivene su metodom izračuna opisanom u radu od Botsteina i sur. (1980.).

Tablica 2. Prikaz broja alela u analiziranih 17 mikrosatelita, veličina odsječaka u parovima baza (pb), opažena heterozigotnost (H_o), očekivana heterozigotnost (H_e), fiksacijski indeks (F_{is}), informacijski sadržaj polimorfizma (PIC), provjera ravnoteže alela prema Hardy-Weinbergovu zakonu ($H-W$; prikazana je p -vrijednost) te broj kromosoma na kojemu se nalazi opisani lokus.

	Broj alela	Veličina (pb)	H_o	H_e	F_{is}	PIC	H-W (p)	Kromosom
VHL20	5	83–102	0,833	0,75	-0,111	0,708	0,62	30
HTG4	1	116–137	0	0	-	0	-	9
AHT4	4	140–166	0,667	0,625	-0,067	0,559	0,91	24
HMS7	4	167–187	0,5	0,417	-0,2	0,393	0,99	1
HTG6	4	74–103	0,5	0,514	0,027	0,393	0,53	15
AHT5	6	126–147	1	0,806	-0,241	0,777	0,88	8
HMS6	3	154–170	0,5	0,569	0,122	0,477	0,64	4
ASB23	4	176–212	1	0,736	-0,359	0,687	0,81	3
ASB2	3	237–268	0,8333	0,569	-0,463	0,477	0,42	15
HTG10	5	83–110	0,667	0,681	0,02	0,643	0,31	21
HTG7	4	114–128	0,667	0,583	-0,143	0,53	0,75	4
HMS3	3	146–17	0,5	0,625	0,2	0,555	0,23	9
HMS2	5	215–236	1	0,722	-0,385	0,68	0,49	10
ASB17	5	104–116	0,833	0,681	-0,225	0,644	0,87	2
LEX3	6	137–160	0,833	0,75	-0,111	0,719	0,58	X
HMS1	4	166–178	0,667	0,583	-0,143	0,53	0,75	15
CA425	4	224–247	0,833	0,653	-0,277	0,599	0,94	17
$\bar{X} \pm$ SD	4,12 \pm 1,22		0,70 \pm 0,24	0,64 \pm 0,10	-0,15 \pm 0,18	0,59 \pm 0,11		

REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati tjelesnih izmjera istraživanih konja (slika 1) prikazani su u tablici 1. S obzirom na malu dostupnost informacija o mjerama dalmatinskog bušaka iz literature, mjere konja iz ovog istraživanja moguće je usporediti samo s visinom u grebenu navedenom u opisu prof. dr. Otona Frangeša (Barać i sur., 2011.) te mjerama iz rada Ivankovića i sur. (2012.) gdje je cilj bio utvrditi osnovne odlike vanjštine navedenih konja kao prvi korak u sustavnoj karakterizaciji populacije. Uspoređujući podatke, mjere dviju jedinki (kojima je jedino bilo moguće pristupiti) iz ovog istraživanja nešto su manjeg tjelesnog okvira od 18 konja iz istraživanja Ivankovića i sur. (2012.), dok se visinom u grebenu nalaze u rasponu visine danom u opisu prof. dr. Otona Frangeša (Barać i sur., 2011.).

U tablici 2 prikazane su mjere raznolikosti istraživanih mikrosatelitskih lokusa. Broj pronađenih alela kretao se od najniže 1 (lokus HTG4) do najviše 6 (lokusi AHT5 i LEX3). Svi istraživani lokusi, osim lokusa HTG4, bili su polimorfni te imali najmanje tri različita alela. Ukupan broj pronađenih alela bio je 70, a prosječan broj alela po svakom lokusu 4,12 (tablica 2).

Opazena heterozigotnost (H_o) jest udio heterozigotnih jedinki u analiziranom uzorku. U istraživanih konja raspon H_o kretao se od 0 (lokus HTG4) do 1 (lokusi AHT5, ASB23 i HMS2), a u prosjeku je iznosio 0,70 (tablica 2). Očekivana heterozigotnost (H_e), koja također ukazuje i na gensku raznolikost populacije, predstavlja udio jedinki u populaciji koje bi bile heterozigotne kad bi populacija bila u genetskoj ravnoteži prema Hardy-Weinbergovom zakonu. Vrijednost H_e dobivena u ovoj preliminarnoj analizi na manjem uzorku bile su u rasponu od 0 (lokus HTG4) do 0,806 (lokus AHT5), a u prosjeku 0,60 (tablica 2).

Fiksacijski indeks (F_{is} ; WRIGHT, 1931.), zvan i koeficijent uzgoja u srodstvu (engl. *inbreeding coefficient*), upućuje na smanjenje odnosno povećanje heterozigotnosti u populaciji u odnosu na populaciju koja je u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Ako je $F_{is} = 0$, populacija je u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, za $F_{is} > 0$ u populaciji postoji nedostatak heterozigota, a za $F_{is} < 0$ postoji višak heterozigota u populaciji. Uspoređujući H_o i H_e , utvrđen je veći ukupni opaženi (H_o) od očekivane heterozigotnosti (H_e),

iz čega se može zaključiti da u analiziranih jedinki ima višak heterozigotnih jedinki u odnosu na onu u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (tablica 2). Pronađeni višak heterozigotnosti utječe i na vrijednosti fiksacijskog indeksa (F_{is}) koji je zbog toga negativan (-0,15). Veći H_o od H_e utvrđen je i u 12 od promatranih 17 lokusa, dok je za 4 lokusa (HTG6, HMS6, HTG7 i HMS3) H_e veći od H_o . U 11 od 12 lokusa s većim H_o od H_e utvrđen je i negativni F_{is} , dok je za lokus HTG10 on gotovo jednak nuli (0,02). Od 4 lokusa s većim H_e od H_o , tri imaju pozitivne vrijednosti F_{is} -a, odnosno nedostatak heterozigota, a jedan (HTG7) ima negativnu vrijednost (-0,143; tablica 2). Lokus HTG4 nije uključen u ovaj izračun zbog svoje monomorfosti.

Informacijski sadržaj polimorfizma (PIC; BOTSTEIN i sur., 1980.) opisuje genotipske varijacije unutar promatranog lokusa s obzirom na broj alela i njihovu frekvenciju. Kao navedeno mjerilo alelne raznolikosti jest udio informativnog potomstva, odnosno vjerojatnost da će se genotip potomstva moći upotrijebiti u svrhu saznanja od kojega roditelja potječu pojedini aleli. Vrijednost PIC-a kreće se od 0 do 1. Vrijednosti blizu nule upućuju na to da nema varijacije u alelima, veća vrijednost upućuje na veću varijaciju alela, a najviše može dosegnuti 1 što pokazuje da lokus ima samo različite alele. Na ljestvici vrijednosti PIC $> 0,5$ upućuje na visokoinformativne markere, $0,25 < PIC < 0,5$ srednje informativne, a $PIC < 0,25$ na niskoinformativne ili neinformativne. Od 17 istraživanih lokusa 12 se pokazalo visokoinformativnog karaktera (VHL20, AHT4, AHT5, ASB23, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1 i CA425), 4 srednje informativnog (HMS7, HTG6, HMS6 i ASB2), a samo 1 neinformativnog – i to zato što je lokus HTG4 monomorfan (tablica 2).

U tablici 3 prikazani su pronađeni aleli i njihova frekvencija pri svakom pojedinom promatranom lokusu. Raspon pronađenih frekvencija alela u svih 17 lokusa kretao se od 8,3% do 100% (tablica 3). U lokusu HTG4 pronađen je samo jedan alel (alel M). Od svih alela njih 29 nalazilo se u pojavnosti manjoj od 10%, tj. da su prisutni samo u jedne jedinke u istraživanom uzorku, a moguće da su prisutni i u malom broju jedinki u populaciji. U usporedbi s alelima više frekvencije (i do 100%), slabije zastupljeni aleli imaju veću vjerojatnost nestanka iz populacije,

Tablica 3. Frekvencije alela 17 promatranih lokusa.

	Alel F	Alel G	Alel H	Alel I	Alel J	Alel K	Alel L	Alel M	Alel N	Alel O	Alel P	Alel Q	Alel R	Alel S
VHL20				0,0833				0,0833	0,3333		0,25	0,25		
HTG4								1						
AHT4			0,5	0,0833		0,3333	0,0833							
HMS7							0,75	0,0833	0,0833			0,0833		
HTG6		0,0833		0,0833						0,75			0,0833	
AHT5					0,25	0,0833	0,25	0,0833	0,1667	0,1667				
HMS6								0,4167		0,0833	0,5			
ASB23				0,3333		0,1667	0,25							0,25
ASB2				0,0833		0,4167			0,5					
HTG10			0,0833			0,5			0,1667				0,0833	0,1667
HTG7						0,0833		0,0833	0,5833	0,25				
HMS3				0,25						0,25	0,5			
HMS2			0,1667	0,0833		0,4167	0,0833				0,25			
ASB17		0,4167		0,0833		0,0833			0,0833			0,3333		
LEX3	0,1667	0,4167		0,0833			0,1667	0,0833			0,0833			
HMS1					0,25	0,0833	0,0833	0,5833						
CA425							0,1667	0,5	0,25	0,0833				

a gubitak tih rijetkih alela jest i gubitak genetskih varijanti koje mogu biti bitne iz perspektive uzgoja (Mesarić i sur., 2015.).

Unatoč činjenici da je danas pristupa populacija konja u tipu dalmatinskog bušaka vjerojatno mala (točan broj je nepoznat), većina je promatranih lokusa polimorfna i razlikuje se među individualnim konjima. Također, prilikom provjere geneske ravnoteže alela prema Hardy-Weinbergovu zakonu nisu pronađena statistički značajna odstupanja, tj. svi su lokusi bili u genskoj ravnoteži prema Hardy-Weinbergovu zakonu, osim monomorfnog lokusa HTG4 za koji to nije moguće izračunati (tablica 2). Iako

su rezultati ovog preliminarnog istraživanja ograničenog značenja zbog malog broja jedinki, to su prvi podaci o genskoj raznolikosti konja u tipu dalmatinskog bušaka. Dobiveni rezultati su poticaj za daljnji pronalazak i analizu većeg broja jedinki u tipu dalmatinskog bušaka te njihova usporedba s bosansko brdskim konjem.

ZAKLJUČCI

- Istraživani konji nešto su sitnije građe u odnosu na mjere dostupne iz literature.
- U 17 istraživanih lokusa pronađeno je ukupno 70 različitih alela, a broj po pojedinom

lokusu se kretao od 1 do 6.

- Svi istraživani lokusi, osim jednoga (HTG4), bili su polimorfni.
- Temeljem prikupljenih rezultata preliminari izračun prosječne opažene heterozigotnosti (H_0) iznosi 0,7, a očekivana je 0,6 te je stoga fiksacijski indeks (F_{IS}) negativan.
- Temeljem prikupljenih rezultata preliminari izračun prosječnog informacijskog sadržaja polimorfizma (PIC), kao i za većinu lokusa zasebno (12), upućuje na visokoinformativne markere.
- Raspon frekvencija alela u svih 17 lokusa kretao se od 8,3% do 100%.
- 29 alela nalazilo se u pojavnosti manjoj od 10%, tj. bilo je prisutno u samo jedne jedinke u istraživanom uzorku.
- Unatoč malom uzorku svi su promatrani lokusi bili u genetskoj ravnoteži prema Hardy-Weinbergovu zakonu.

LITERATURA

- ANONIMUS (2018): FAO – Biodiversity for a world without hunger. [citirano 13. travnja 2018.]. Dostupno na: <http://www.fao.org/biodiversity/components/animals/en/>
- ANONIMUS (2018a): The ISAG Profile for Canine and Equine DNA Testing. [citirano 16. travnja 2018.]. Dostupno na: <https://animal-genetics.us/wordpress/2013/11/the-isag-profile-for-canine-and-equine-dna-testing/>
- BARAĆ, Z., LJ. BEDRICA, M. ČAČIĆ, M. DRAŽIĆ, M. DADIĆ, M. ERNOIĆ, M. FURY, Š. HORVATH, A. IVANKOVIĆ, Z. JANJEČIĆ, J. JEREMIĆ, N. KEZIĆ, D. MARKOVIĆ, B. MIOČ, R. OZIMEC, D. PETANJEK, F. POLJAK, Z. PRPIĆ, M. SINDIČIĆ (2011): Zelena knjiga izvornih pasmina Hrvatske. Kerschoffset d.o.o., Republika Hrvatska.
- BINNS, M. M., N. G. UOLMES, A. M. HOLLIMAN (1995): The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *Brit. Vet. J.* 151, 9–15.
- BOTSTEIN, D., R. L. WHITE, M. SHOLNICK, R. W. DAVID (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314–331.
- BREEN, M., G. LINDGREN, M. M. BINNS, J. NORMAN, Z. IRVIN, K. BELL, K. SANDBERG, H. ELLEGREN (1997): Genetical and physical assignments of equine microsatellites—first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mamm. Genome* 8, 267–273.
- COOGLE, L., E. BAILEY, R. REID, M. RUSS (1996): Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci LEX002, -003, -004, -005, -007, -008, -009, -010, -011, -013 and -014. *Anim. Genet.* 27, 126–127.
- DRUML, T., I. CURIK, R. BAUMUNG, K. ABERLE, O. DISTL, J. SOLKNER (2007): Individual-based assessment of population structure and admixture in Austrian, Croatian and German draught horses. *Heredity* 98, 114–122.
- EGGLESTON-STOTT, M., A. L. DELVALLE, M. BAUTISTA, D. DILEANIS, E. WICTUM, A.T. BOWLING (1997): Nine equine dinucleotide repeats at microsatellite loci UCDEQ136, UCDEQ405, UCDEQ412, UCDEQ425, UCDEQ437, UCDEQ467, UCDEQ487, UCDEQ502 and UCDEQ505. *Anim. Genet.* 28, 370–371.
- ELLEGREN, H., M. JOHANSSON, K. SANDBERG, L. ANDERSSON (1992): Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim. Genet.* 23, 133–142.
- FAO (2007): The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Roma, Italy.
- GALOV, A., K. BYRNE, M. ĐURAS-GOMERČIĆ, T. GOMERČIĆ, Z. NUSHOL, D. VINCEK, I. KOCIJAN, Z. TADIĆ, V. BENKOVIĆ, I. BAŠIĆ, S. M. FUNK (2005): Effectiveness of nine polymorphic microsatellite markers in parentage testing in Posavina, Croatian Coldblood and Lipizzaner horse breeds in Croatia. *Livestock Prod. Sci.* 93, 277–282.
- GALOV, A., K. BYRNE, T. GOMERČIĆ, M. ĐURAS, H. ARBANASIĆ, M. SINDIČIĆ, D. MIHELJIĆ, A. KOVAČIĆ, S. M. FUNK (2013): Genetic structure and admixture between the Posavina and Croatian Coldblood in contrast to Lipizzan horse from Croatia. *Czech J. Anim. Sci.* 58, 71–78.
- GUERIN, G., M. BERTAUD, Y. AMIGUES (1994): Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6,

- HMS7 and HMS8. *Anim. Genet.* 25, 62.
- IRVIN, Z., J. GIFFARD, R. BRANDON, M. BREEN, K. BELL (1998): Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci ASB 21, 23, 25 and 37-43. *Anim. Genet.* 29, 67.
 - IVANKOVIĆ, A., J. RAMLJAK, P. DOVČ, N. KELAVA, M. KONJAČIĆ (2009): Genetic structure of three Croatian horse breeds: implications for their conservation strategy. *Ital. J. Anim. Sci.* 8, 677-689.
 - IVANKOVIĆ, A., J. RAMLJAK, Š. HORVAT (2012): Odlike vanjštine tovarnih konja mediteranske Hrvatske. Proceedings of the 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture, 13 – 17 February, Opatija, Croatia, 688-692.
 - MAHROUS, K. F., M. HASSANANE, M. ABDEL MORDY, H. I. SHAFEY, N. HASSAN (2011): Genetic variations in horse using microsatellite markers. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 9, 103-109.
 - MARKLUND, S., H. ELLEGREN, S. ERIKSSON, K. SANDBERG, L. ANDERSSON (1994): Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim. Genet.* 25, 19-23.
 - MARLETTA, D., I. TUPAC-YUPANQUI, S. BORDONARO, D. GARCIA, A. M. GUASTELLA, A. CRISCIONE, J. CANON, S. DUNNER (2006): Analysis of genetic diversity and the determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers. *J. Anim. Breed. Genet.* 123, 315-325.
 - MESARIČ, M., A. DOLINŠEK, P. DOVČ (2015): Bosanski planinski konj: najsarejša avtohtona pasma na Balkanu v izumiranju. Založba Grahovac d.o.o., Ljubljana, Slovenija.
 - VAN HAERINGEN, H., A. T. BOWLING, M. L. STOTT, J. A. LENSTRA, K. A. ZWAAGSTRA (1994): A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. *Anim. Genet.* 25, 207.
 - WRIGHT, S. (1931): Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16, 97-159.
 - YE, F. C., R. YANG, T. J. BOYLE, Z. YE, J. M. XIYAN (2000): POPGENE 32. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada.

44th World Small Animal Veterinary Association Congress & 71st Canadian Veterinary Medical Association Convention

16-19 July, 2019
Toronto, Canada

SAVE THE DATE

