

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Ljubodrag D. Stanišić

Fenotipska i molekularno-genetička
karakterizacija populacije balkanskog
magarca u Republici Srbiji

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Ljubodrag D. Stanišić

Phenotypic and molecular genetic
characterization of Balkan donkey
population in Serbia

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentor 1:

Dr Jevrosima Stevanović, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu

Mentor 2:

Dr Vladimir Dimitrijević, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu

Članovi Komisije:

Dr Zoran Stanimirović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu

Dr Slobodanka Vakanjac, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu

Dr Jelena M. Aleksić, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

"Najveći čovek uvek ostaje dete."

(Gete)

Posvećeno

Kaji, Vasiliju i Jeleni.

Fenotipska i molekularno-genetička karakterizacija populacije balkanskog magarca u Republici Srbiji

Rezime

Balkanski magarac (*Equus asinus* L.) predstavlja ugroženu, neselektovanu, nestrukturiranu i tradicionalno gajenu autohtonu rasu magaraca. Za formiranje standarda rase i implementaciju odgajivačkih, reproduktivnih i mera upravljanja koje bi omogućile očuvanje i održivu eksploataciju balkanskog magarca, neophodan je uvid u fenotipske karakteristike, genetski status i poreklo balkanskog magarca. Stoga, jedan od ciljeva istraživanja je uspostavljanje morfometrijskih, biohemijskih i hematoloških vrednosti za ispitivanu populaciju balkanskog magarca sa teritorije Srbije, kao i utvrđivanje uticaja starosti na ispitivane parametre. Među rasna sličnost morfometrijskih parametara je analizirana upoređivanjem dobijenih podataka za balkanskog magarca sa dostupnim vrednostima morfometrijskih parametara prethodno opisanih rasa magaraca. Takođe, izvršena je procena trenutnog genetičkog diverziteta i strukture tri najveće populacije magaraca u centralnom Balkanu na osnovu varijabilnosti nuklearnih mikrosatelita (77 jedinki) i mitohondrijskog (mtDNK) kontrolnog regiona (49 jedinki). Dobijeni podaci za kontrolni region (HVR1) mtDNK su poređeni sa 209 objavljenih sekvenci mtDNK drevnih i današnjih magaraca poreklom iz 19 evropskih i afričkih populacija da bi se obezbedio uvid u poreklo i istoriju balkanskog magarca.

Ispitivana populacija se sastojala od 77 magaraca, koji su podeljeni u dve starosne grupe (A \leq 3 godine; B $>$ 3 godine). Ukupno, analizirano je 18 morfometrijskih, 13 hematoloških i 14 biohemijskih parametara. Između grupe A i B, uočena je značajna razlika ($P < 0.05$) kod mera za dužinu tela, dužinu glave, obim

grudnog koša i telesne mase. Statistički značajna razlika u morfometrijskim parametrima je postojala između balkanskog magarca i drugih analiziranih rasa magaraca (katalonski, hrvatski i albanski), dok je klaster analiza ukazala da je najveća morfološka sličnost (najmanja distanca) primećena između balkanskog magarca i albanskih magaraca. Na osnovu normalne distribucije vrednosti morfoloških parametara ispitivanih jedinki, kao i statistički značajne morfološke razlike u odnosu na upoređene rase magaraca, dobijene vrednosti telesnih mera za balkanskog magarca se mogu koristiti kao referentne. Rezultati analize hematoloških i biohemijskih parametara ispitivane populacije balkanskog magarca su u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija i imaju vrednosti koje su u opsegu postojećih referentnih vrednosti za magarce. Vrednosti za broj belih krvnih zrnaca (WBC), ukupan broj leukocita (MID) i broj granulocita (GRA) su bile statistički značajno veće ($p < 0.05$) kod mlađe grupe magaraca (A), dok je alkalna fosfataza bila jedini biohemijski parametar koji je takođe bio veći ($p < 0.05$) kod A grupe magaraca.

Uprkos značajnoj depopulaciji u prošlosti, za populaciju balkanskog magarca u Srbiji su dobijene visoke vrednosti genetičkog diverziteta i na nuklearnom i mtDNK nivou. Ispitivana populacija balkanskog magarca je heterogena - nađene su dve grupe jedinki sličnih fenotipskih odlika, donekle udaljenih nuklearnih genetičkih profila i sa različitom proporcijom raspodele mtDNK haplotipova u maternalne klade, 1 i 2. Još jedna grupa magaraca, koju karakteriše veća veličina tela, različita boja dlake, poseban nuklearni genski fond i pretežna pripadnost mtDNK haplotipova kladi 2, je obeležena kao druga rasa, banatski magarac. Populacije magaraca sa Balkanskog poluostrva su pokazale genetičku sličnost sa različitim populacijama etiopskih magaraca, ukazujući na visoku heterogenost, kompleksnije maternalno poreklo i filogenetsku struktuiranost nego što je to pre objavljivano. Pored toga, potvrđena je teorija da se ekspanzija jedinki na Balkansko poluostrvo odvijala preko Grčke. Na osnovu

spektra i geografske distribucije genealoški vezanih linija klade 1 i klade 2 može se zaključiti da su magaraci za koje su karakteristični haplotipovi klade 1 ranije stigli na Balkansko poluostrvo, ali da je njihova dalja ekspanzija bila ograničena. Iako su magarci koji nose haplotipove klade 2 dospeli na Balkan nakon magaraca iz klade 1, imali su uspešnu ekspanziju i diversifikaciju u ovom regionu.

Ključne reči: balkanski magarac, karakterizacija rase, parametri krvi, morfometrija, nuklearni mikrosateliti, mtDNK kontrolni region, genetički diverzitet, genetička struktura, filogeografija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Veterinarska genetika

UDK broj: 619:577.21:636.182

Phenotypic and molecular genetic characterization of Balkan donkey population in Serbia

Summary

The Balkan donkey (*Equus asinus* L.) is commonly regarded as endangered, large-sized, unselected, unstructured and traditionally managed donkey breed. In order to provide basis for development of the breed standard, conservation programme and breeding management, new insights into phenotypic features, current genetic status and origin of the Balkan donkey are needed. One of the goals of the study was to establish morphometric, biochemical and hematological values for the studied Balkan donkey population (Serbia) and to explore possible age dependence of the parameters tested. Inter-breed similarity of morphometric parameters was assessed by comparing the data obtained for the Balkan donkey with morphometric measurements of several previously characterized domestic donkey breeds. Furthermore, we assess the current genetic status of the three largest *E. asinus* populations in the central Balkans by sampling the variability within nuclear microsatellites (77 individuals) and the mitochondrial (mtDNA) control region (49 individuals). We further analyse our mtDNA dataset along with 209 published mtDNA sequences of ancient and modern individuals from 19 European and African populations to provide new insights into the origin and the history of the Balkan donkey.

The study population included 77 donkeys, divided in two age groups (group A \leq 3 years; group B $>$ 3 years). In total, 18 morphometric, 13 hematological and 14 biochemical parameters were assessed. Significant morphometric differences ($p < 0.05$) in body length, head length, chest circumference and body weight were found between two age groups. Significant differences in morphological parameters were revealed among the Balkan donkey and other donkey breeds (Catalonian, Croatian and Albanian), but results of cluster analysis demonstrated the smallest distance between the Balkan donkey and Albanian donkeys. The results of morphometric analyses showed consistency of the obtained values within the breed, and diversity as compared to other donkey breeds, and,

thus, could be taken as referent for the Balkan donkey. Hematological and biochemical profiles obtained for the Balkan donkey were consistent with previous reports and within the recommended reference ranges. White blood cell, mid cell and granulocyte counts, showed significantly higher ($p < 0.05$) values in donkeys under 3 years of age, while the only biochemical parameter affected by age was alkaline phosphatase.

Serbian donkey populations are highly genetically diverse at both the nuclear and mtDNA levels despite past severe size reductions. Traditional Balkan donkeys in Serbia are rather heterogeneous—we found two groups of individuals of similar phenotypic features, somewhat distinct nuclear backgrounds, and different proportions of mtDNA haplotypes belonging to *E. asinus* matrilineal Clades 1 and 2. Another group, characterized by the larger body size, different coat colour, distinct nuclear gene pool and predominantly Clade 2 haplotypes, was delineated as the Banat donkey breed. Local donkey populations from the Balkan Peninsula display genetic affinities towards different Ethiopian domestic donkey populations suggesting that the maternal landscape of the large Balkan donkey population is highly heterogeneous and more complex than previously thought. Given the two independent domestication events in donkeys, multiple waves of introductions into the Balkans from Greece were hypothesized. Clade 2 donkeys probably appeared in Greece prior to those belonging to Clade 1, while expansion and diversification of Clade 1 donkeys within the Balkans predated that of Clade 2 donkeys.

Keywords: Balkan donkey, breed characterization, blood parameters, morphological measures, nuclear microsatellites, mitochondrial control region, genetic diversity, genetic structuring, phylogeography

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Veterinary Genetics

UDC Number: 619:577.21:636.182

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Pregled literature	4
2.1 Poreklo vrste magarac	4
2.2 Arheološki i genetički dokazi o poreklu i domestikaciji magarca	6
2.3 Rasprostranjenost i ugroženost rasa magaraca	12
2.4 Fenotipska i genetička varijabilnost u okviru vrste <i>E. asinus</i>	17
2.5 Značaj fenotipske karakterizacije	18
2.5.1 Fenotipske karakterizacije rasa u okviru vrste magarac	21
2.6 Organizacija genoma vrste magarac	24
2.7 Genetički markeri	28
2.7.1 Proteinski markeri	28
2.7.2 DNK markeri	30
2.8 Genetička karakterizacija farmskih životinja primenom mtDNK i mikrosatelita	44
2.8.1 Genetička karakterizacija vrste magarac primenom jedarnih mikrosatelita	52
2.8.2 Genetička karakterizacija vrste magarac primenom mtDNK	57
2.9 Balkanski magarac	61
3. Cilj i zadaci	67
4. Materijal i metod	69
4.1 Studijska populacija	69
4.2 Merenje telesnih parametara	71
4.3 Hematološke i biohemijske analize krvi	72
4.4 Ekstrakcija DNK	73
4.5 Procena prinosa i čistoće ekstrahovane DNK	74

4.6 Molekularno genetička analiza ispitivanih jedinki rase balkanski magarac primenom mikrosatelitskih lokusa	75
4.6.1 Karakteristike izabranih nuklearnih mikrosatelita	75
4.6.2 PCR amplifikacija mikrosatelitskih lokusa	77
4.6.3 Kapilarna elektroforeza	78
4.6.4 Određivanje dužine produkata PCR amplifikacije nuklearnih mikrosatelita	80
4.7 Molekularno genetička analiza ispitivanih jedinki rase balkanski magarac na osnovu sekvenci HVR1 regiona (mtDNK)	81
4.8 Statistička analiza dobijenih podataka	83
5. Rezultati	89
5.1. Morfometrijski parametri rase balkanski magarac	89
5.2 Hematološki i biohemijski parametri krvi rase balkanski magarac	93
5.3 Molekularno genetičke analize	97
5.3.1 Karakteristike jedarnih mikrosatelita	97
5.3.2 Genetički diverzitet rase balkanski magarac na nivou jedarnog genoma	99
5.3.3 Odstupanja učestalosti gena od Hardy-Weinberg očekivanja i neravnotežna vezanost parova lokusa u ispitivanim populacijama balkanskog magarca	103
5.3.4 Genetički diverzitet ispitivanih populacija balkanskog magarca na nivou mitohondrijskog genoma	107
5.3.5 Genetička struktura ispitivanih populacija balkanskog magarca	109
5.4 Utvrđivanje porekla i odnosa ispitivanih populacija balkanskog magarca sa drugim populacijama magaraca na osnovu filogenetskih i filogeografskih analiza	116

6. Diskusija	121
6.1 Fenotipska karakterizacija rase balkanski magarac	125
6.1.1 Morfometrijski parametri ispitivanih populacija balkanskog magarca	125
6.1.2 Hematološki i biohemijski parametri ispitivanih populacija balkanskog magarca	127
6.2 Genetički diverzitet ispitivanih populacija balkanskog magarca u Srbiji	130
6.2.1 Parametri genetičke raznovrsnosti: ukupan broj alela, broj alela po pojedinačnim lokusima i frekvence alela	130
6.2.2 Parametri genetičke raznovrsnosti: dobijena i očekivana heterozigotnost	135
6.2.3 Odstupanja učestalosti gena od Hardy-Weinberg očekivanja i neravnotežna vezanost parova lokusa	138
6.2.4 Parametri genetičkog diverziteta na osnovu analize mtDNA	140
6.3 Genetička struktura ispitivanih populacija balkanskog magarca	141
6.4 Genetička struktura ispitivanih populacija balkanskog magarca dobijena analizom mtDNA	145
6.5 Poreklo i evolutivna istorija ispitivanih populacija balkanskog magarca	147
7. Zaključci	154
8. Zahvalnica	156
9. Literatura	157

1. Uvod

Magarci su bili sastavni deo svakodnevnog života ljudi kroz istoriju i korišćeni su pre svega kao životinje za transport, ali i kao izvor mesa i mleka. Usled sve većeg uvođenja mehanizacije i automatizacije tokom prethodnih decenija u sve aspekte poljoprivredne proizvodnje i transporta, danas su magarci izgubili svoj ekonomski značaj. Kao rezultat navedenih promena, broj i diverzitet rasa magaraca je znatno opao na globalnom nivou, a trenutno, umanjene populacije magaraca se održavaju uglavnom u ruralnim područjima širom sveta u kojima se još uvek koriste kao transportne životinje. Depopulaciju rasa magaraca pratio je i nedostatak dobro planirane strategije parenja koja je posledično izazivala gubitak naslednih osobina kod pojedinih rasa. Magarci kao vrsta domaćih životinja su trenutno jedna od najmanje proučavanih i najzapostavljenijih na svetu. U cilju sprovođenja programa očuvanja i gajenja magaraca, neophodna je identifikacija postojećih rasa magaraca, utvrđivanje veličina populacija, prikupljanje podataka o njihovom uzgoju i sprovođenje fenotipske i genetičke karakterizacije. Za većinu rasa magaraca takvi podaci ne postoje ili su nepotpuni, pa su neophodni konkretni postupci u cilju njihove zaštite i opstanka.

Prema literaturnim podacima, populacija magaraca na Balkanskom poluostrvu su od velikog značaja za razumevanje evolutivne istorije evropskih magaraca. Smatra se da su Grci u 2. milenijumu p.n.e. introdukovali magarce iz njihovih afričkih kolonija na mediteransku obalu i Balkan, i da su se magarci sa Balkanskog poluostrva raširili kroz Evropu tokom Rimskog carstva. Iako navedeni podaci sugerišu da bi fenotipska i genetička istraživanja domaćih magaraca sa Balkanskog poluostrva bila od suštinskog značaja za bolje razumevanje post-domestikacijskog širenja magaraca Evropom, populacija balkanskog magarca je još uvek neproučena i sagledava se kao populacija podvrgnuta tradicionalnom menadžmentu sa stohastičnim protokom gena. Detaljnih podataka o

morfometrijskim, hematološkim i biohemijskim parametrima balkanskog magarca na teritoriji Srbije nema. Ispitivanjem varijabilnosti HVR1 regiona kod 132 jedinki iz deset populacija balkanskog magarca, nađena je slaba genetička diferencijacija u ispitivanim populacijama kao i nedostatak regionalne genetičke strukture, što ukazuje na prilično brzo širenje magaraca u okviru Balkanskog poluostrva nakon introdukcije. Međutim, s obzirom na ograničenu veličinu uzorka u ovoj studiji kod nekoliko ispitivanih populacija balkanskog magarca, nedostatku sistematske karakterizacije rasa magaraca poreklom iz ovog regiona i novim saznanjima o postojanju fenotipski i genetički različitih populacija unutar Balkana koje pripadaju drugim alternativnim rasama, dalja istraživanja na populacijama balkanskog magarca su neophodna.

Na osnovu prethodno pomenutih istorijskih podataka, ali i činjenice da balkanski magarac predstavlja jednu od veoma ugroženih, najstarijih autohtonih rasa domaćih životinja na Balkanskom poluostrvu i genetički resurs Republike Srbije, neophodno je izvršiti fenotipsku i genetičku karakterizaciju rase balkanski magarac. Fenotipska karakterizacija je obuhvatila merenje 17 morfometrijskih parametra, analizu hematoloških i biohemijskih profila krvi. Korišćenjem molekularnih DNK markera (autozomalnih mikrosatelitskih i mtDNK lokusa) po prvi put je izvršena genetička karakterizacija rase balkanski magarac poreklom iz Srbije. Cilj istraživanja na nivou nuklearnog i mitohondrijskog genoma je uvid u trenutni genetički status populacija balkanskog magarca poreklom iz centralnog Balkana čime bi se pružila nova saznanja vezana za poreklo i evolutivnu istoriju balkanskog magarca. S obzirom na progresivnu depopulaciju magaraca iz ovog regiona, podaci o stepenu genetičkog diverziteta i diferencijacije na nivou nuklearne i mitohondrijske DNK su neophodni za formiranje strategija za očuvanje diverziteta i implementaciju odgajivačkih, reproduktivnih i mera

upravljanja koje bi omogućile očuvanje i održivu eksploataciju balkanskog magarca.

2. Pregled literature

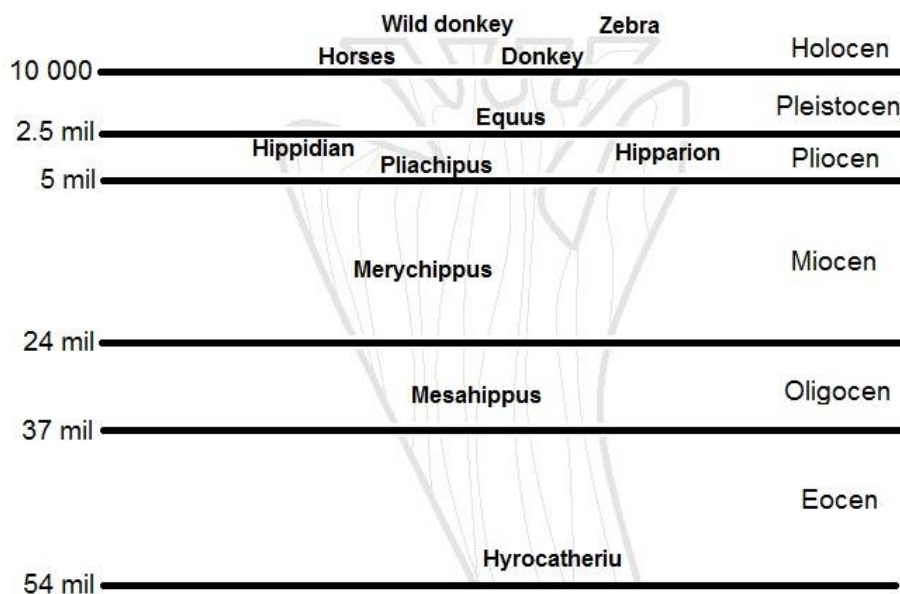
Vrsta magarac (*Equus asinus*, L., 1758) pripada porodici Equidae koja sa porodicama Rhinocerotidae i Tapiridae, spada u red kopitara (Perissodactyla, Mammalia). Kopitare karakteriše neparan broj prstiju (jedan ili tri) koji su obloženi snažnim rožnim navlakama u obliku kopita i karakteristično unguigradno oslanjanje na vrhove prstiju. Iako se hrane slično preživarima (papkarima), imaju jednostavno građen želudac i celulozu vare u crevima. Danas postoje dve odomaćene vrste kopitara koje su raširene su po celom svetu - konj (*Equus caballus*) i magarac (*Equus asinus*). Domaći magarac, za razliku od drugih domaćih životinja, nije podlegao značajnijim promenama u upotrebi tokom 7.000 godina odomaćivanja. Razlike u načinu uzgoja i upotrebi, podneblju i klimatskim uslovima, doprinele su pojavi većeg broja morfoloških promena između rasa. Sistematski gajene rase magaraca su retke, a čest je slučaj da i postojeće rase nisu fenotipski i genetički precizno opisane. Domaće rase magaraca su telesne mase između 80 i 480 kg, a visina u grebenu je u intervalu od 80 do 160 cm. Magarci žive u proseku 30 do 35 godina i mogu biti radno aktivni do duboko u starost. Mužjaci većine rasa magaraca polno sazrevaju sa tri godine, a ženke u uzrastu od godinu dana. Magarci se pare najčešće u periodu od aprila do jula, a graviditet traje od 11 do 14 meseci. Ženke nose uglavnom jedan plod. Magarce karakteriše lak odgoj, otpornost na bolesti, izdržljivost, skladan karakter, istrajnost i strpljivost.

2.1 Poreklo vrste magarac

Smatra se da su se kopitari pojavili pre 55 miliona godina, tj. za vreme trajanja Paleocensko-Eocenskog toplotnog maksimuma, kada je došlo do divergencije kopitara (zajedno sa papkarima i primatima) i to na području tadašnjeg Holarktika (Gingerich, 2006; Smith i sar., 2006; 2015). U periodima

Miocena (pre 24 do 5 miliona godina) i Pleistocena (pre 2.5 miliona godina) kopitari nastanjuju većinu severnih i južnih kontinenata (Kruger i sar., 2005) pri čemu se beleže fenotipske adaptacije (razlike u veličini tela) u zavisnosti od sredine u kojima su živeli (MacFadden, 1986; Vilstrup i sar., 2013). Simpson (1951) i Lindsay i sar. (1980) tvrde da je diversifikacija roda *Equus* otpočela pre 3-5 miliona godina. Koristeći restrikciono-endonukleazne analize na mitohondrijskoj DNK (mtDNK) kopitara, George i Ryder (1986) su potvrdili prethodne nalaze i predložili da se evoluciono razilaženje među kopitarima odigralo pre oko 3,9 miliona godina. Burchelli zebra (*Equus burchelli*) i magarac (*Equus asinus*) su dve vrste kopitara koje su divergirale pre oko 0,9 miliona godina, dok se njihov zajednički predak odvojio od konja (*Equus caballus*) pre oko 2 miliona godina (Oakenfull i sar., 2000)

Dugo se verovalo da postoje dva različita pravca domestikacije današnjih rasa magaraca, odnosno, da postoje linije azijskog i afričkog porekla (Epstein H., 1971; Clutton-Brock, 1992). Molekularno-genetička istraživanja isključila su azijske linije divljih magaraca kao moguće pretke (Beja-Pereira i sar., 2004) i na osnovu analiza mtDNK dokazali postojanje dve različite haplogrupe današnjih rasa magaraca, klade 1 i 2 (Beja-Pereira i sar., 2004; Vila i sar., 2006; Kimura i sar., 2011). Na osnovu do sada objavljenih podataka, smatra se da današnje rase magaraca vode poreklo od afričkih divljih magaraca, gde se kao preci magaraca iz klade 1 navode nubijski divlji magarci (*E. asinus africanus*, Heuglin and Fitzinger, 1866) dok se za pretke magaraca iz klade 2 smatraju izumrli srodnici somalijskog divljeg magarca (*E. a. somaliensis*, Noack 1884) (Kimura i sar., 2011). Pored nubijskog i somalijskog divljeg magarca pominje se i izumrli afrički divlji magarac - Atlas kao mogući predak (Kimura i sar., 2011) za kojeg se pretpostavlja da je nestao u periodu rimskog carstva (Kugler i sar., 2008).



Slika 1. Filogenetsko stablo ekvida (Kugler i sar., 2008)

2.2 Arheološki i genetički dokazi o poreklu i domestikaciji magarca

Većina današnjih vrsta domaćih životinja je pripitomljena pre mnogo milenijuma (Covan i Votson, 1992; Smit, 1997). Među njima, domaći ekvidi su dobro prihvaćeni od strane ljudi i brzo su se raširili po celom evroazijskom području (Fielding i Starkey, 2004).

Pored već ranije pripitomljenih sisara (goveda) u Africi pre 8.000-7.000 godina (Marshall i Hildebrand, 2002), magarci su se brzo pokazali kao životinje sa boljim karakteristikama za potrebe transporta. Naime, na osnovu pronađenih slika na stenama u oblasti centralne Sahare, smatra se da su goveda služila za potrebe transporta, kao izvor mesa i mleka pre nego što je za to korišćen magarac (Muzzolini, 2000). Međutim, širenjem pustinjskih delova klimatski uslovi su počeli da se menjaju, pa goveda nisu predstavljala idealan izbor za obavljanje poslova transporta pod sušnim uslovima jer su njihove potrebe za vodom velike, bar svaki

drugi dan (Dahl i Hjort, 1976). Divlji magarci, s druge strane, su prilagođeni toplim i surovim uslovima sredine i zahtevaju manji unos vode jer ne preživaju. Magarci su takođe u stanju da svare grube trave, imaju fleksibilan metabolizam i u stanju su da izdrže dugo bez vode (Maloi, 1970; Maloi i Boarer, 1971; Marshall, 2007). Stoga, afrički divlji magarac poseduje različite fiziološke i morfološke prednosti u odnosu na goveda za potrebe transporta u vreme nepredvidivih padavina i pustinjskih klimatskih uslova. Rasprostranjenost nađenih ostataka drevnih magaraca u pastirskim regionima Afrike na lokacijama udaljenim od Nila, sugeriše da su bar neke od ovih životinja pripitomljene od strane afričkih uzgajivača (Marshall, 2007; Marshall i Weissbrod, 2009). Domestikacija magarca je od izuzetnog značaja za razvoj ljudskih društava posebno u južnim i sušnim regionima Evroazije i Severne Afrike, budući da su magarci otporniji na suroviji klimat i manje zahtevni u pogledu ishrane od konja (Kimura i sar., 2013). Druga važna posledica pripitomljavanja magaraca je mogućnost stvaranja hibrida sa konjima (mule i mazge). Osim što su obezbeđivali meso, mleko i kožu, kopitari su uticali na mobilnost i transportnu sposobnost ljudi, tj. kretanje je postalo brže, dalje i sa većim kapacitetom prenošenja tereta (Clutton - Brock, 1992, Monti i sar., 2007). Povećana mobilnost ljudi i dobara pripitomljavanjem kopitara omogućila je osvajanje velikih teritorija, taktičku prednost, što je imalo značajnu ulogu u nastanku civilizacija širom Bliskog istoka i evroazijske stepe (Diamond, 2002).

Arheološki, istorijski i etnografski podaci pokazuju da su postojale najmanje tri različite rase divljih magaraca u Africi pre 2.000 godina, od kojih su samo dve preživele i danas postoje (Groves, 1986; Marshall, 2000; Slika 2). Današnji somalijski divlji magarac spada u magarce krupnije telesne građe i poseduje crne pruge na nogama. Spada u kritično ugrožene rase i još uvek se može naći u Somaliji, Etiopiji i Eritreji (Moehlman i sar., 2002). Druga rasa je nubijski divlji magarac koga karakteriše istaknut krst na ramenom delu tela,

naseljava severni Sudan i Eritreju. Pod krstom se podrazumevaju dve linije crne pigmentacije dlačnog pokrivača kod većine rasa magaraca, tj. jedna linija se prostire duž kičmenog stuba a druga je normalna na nju i seče je u predelu ramenog pojasa. Poslednjih godina uočen je mali broj nubijskih divljih magaraca (Kimura i sar., 2011; 2013) koji, kao i somalijski divlji magarac, spada u kritično ugrožene rase magaraca (Moehlman i sar., 2002).



Slika 2. Izgled atlas, nubijskog i somalijskog divljeg magarca (Kimura i sar., 2013).

Treća rasa magaraca je Atlas divlji magarac koji je izumro u rimsko doba. Na ramenom delu je imao pigmentaciju dlačnog pokrivača u obliku krsta (kao nubijski divlji magarac) ali i prugastu pigmentaciju na nogama (kao kod somalijskog divljeg magarca) (Muzzolini, 2000). Na osnovu arheoloških nalaza, jasno je da se drevna distribucija afričkih divljih magaraca odvijala u severoistočnom delu Afrike pre najmanje 20.000 godina (Groves, 1986; Marshall, 2007; Kimura i sar., 2011), a zahvatala je i teritorije današnjeg Jemena i Levant – zemlje koje leže uz obale istočnog Mediterana (Uerpmann, 1991). Zbog nedostatka dokaza postojanja afričkih divljih magaraca u kasnijem paleolitu na području Levanta i mogućeg preklapanja nađenih skeleta divljih magaraca sa prvim

domestifikovanim magarcima, danas postoji sumnja u to da li je *E. africanus* došao u zapadnu Aziju (Slika 3) (Marshall i Weissbrod, 2011).



Slika 3. Mapa koja pokazuje istorijsku distribuciju afričkih divljih magaraca i njihove areale: (A) Atlasa, (B) nubijskog divljeg magarca, (C) somalijskog divljeg magarca (Kimura i sar., 2013).

Magarci su obično gajeni u malom broju, pa je malo arheoloških ostataka sa kojima bi se proučavao proces njihovog odomaćenja (Kimura i sar., 2013). Arheološki i paleontološki dokazi o smanjenju veličine populacije divljih magaraca i prisustvo domaćih magaraca na egipatskim predinastijkim teritorijama El Omari (4.800-4.500 pne) i Maadi (4.000-3.500 pne) mogu biti kasni indikator pripitomljavanja (Bökönyi, 1985; Boesneck i sar., 1989; Boesneck i von den Driesch, 1990; Marshall, 2007).

Do danas, genetički podaci ne objašnjavaju u potpunosti procese domestikacije i identifikaciju prvih domaćih magaraca jer procesi odomaćenja deluju na podskupove životinja odabranih iz divljine, a kao rezultat toga ista mtDNK haplogrupa može postojati i između domaćih i divljih magaraca. Međutim, prisustvo dve majčinske haplogrupe kod današnjih magaraca sugeriše da su ljudi pripitomili magarce u dva vremenski različita događaja, tj. iz dve

različite grupe divljih magaraca, ili alternativno, da su ljudi dovodili ženke u stada iz različitih populacija divljih magaraca (Kimura i sar., 2013). Na osnovu predinastijskih podataka vezanih za prisustvo malih magaraca u slivu reke Nil, domestikacija od najranijih magaraca se dogodila pre približno 6.000 do 7.000 godina (Beja-Pereira i sar., 2004; Marshall, 2007; Kimura i sar., 2011). Međutim, ostaci afričkih divljih magaraca ili prvih domestikovanih magaraca koji datiraju iz vremena oko 6.500 godine pre nove ere identifikovani su u području Ash Shumah u Jemenu (Cattani i Bökönyi, 2002; Marshall, 2007). Cattani i Bökönyi (2002) na osnovu morfološke varijabilnosti tvrde da su pronađene životinje bile u procesu pripitomljavanja. Ostaci magaraca iz Abidosa u Egiptu (oko 3.000 pne) su imali promene na prednjem delu kičmenog stuba karakteristične za životinje koje nose teške terete (Slika 4). Očigledno korišćeni u transportne svrhe, ovi domaći magaraci su zadržali morfološke karakteristike prethodno opisanog afričkog divljeg magarca (Rossel i sar., 2008). Ovaj nalaz ukazuje na mogućnost da bi životinje nađene u Ash Shumah, Jemenu i na Levantu mogle biti identifikovane kao rani domaći magarci iz Afrike (Marshall, 2007). Određivanje porekla domaćih i identifikacija drevnih populacija magaraca je otežano i zbog toga što su rani odgajivači magaraca imali specifičnu praksu da domaće magarce pare sa divljim (Marshall, 2007). Etnografski zapisi takođe dokumentuju slučajeve gde pastiri iz Sudana i Eritreje pare magarice sa divljim magarcima (Baker, 1867; Murray, 1935). Dodatno, u prvoj polovini dvadesetog veka zabeleženo je da Tuareg narod (Berberski narod zapadne i centralne Sahare) hvata divlje magarce (Nicolaisen, 1963). S obzirom da su njihove običaje i ponašanje nasledili od predaka, verovatno je da su i tada nomadska društva hvatala divlje magarce u cilju obnove krda (Kimura i sar., 2013). U nekim slučajevima istorijski Beja nomadi iz Sudana odvajali su divlju pulad od svojih majki, ali i zadržavali mlade divlje životinje na koje bi nailazili (Baker, 1867; Murray, 1935). Takva praksa je obezbedila priliv

divljih osobina i genetičkog materijala kod domaćih magaraca i moguće je da su se na taj način prikriale ili odložile morfološke promene u domaćoj populaciji afričkih magaraca dok nije prekinut kontakt sa divljim životinjama (Kimura i sar., 2013).



Slika 4. Abydos magarci *in situ* u grobnici (Rossel i sar., 2008).

Lingvistički dokazi takođe ukazuju na više od jednog događaja pripitomljavanja magaraca u Africi (Kimura et al., 2013). Postoje tri različita afričkoazijska naziva za magarca, odnosno, *kuur*, *harre* i *aiul* (Blench, 2000). Termin *kuur* se proširio i na druge oblasti Afrike, dok se *harre* koristi u Etiopijskim, a *aiul* u Berberskim jezicima. Blench (2000) smatra da postojanje nekoliko korena reči u okviru jedne porodice jezika sugerise da je magarac pripitomljen nekoliko puta u različitim oblastima severoistočne Afrike.

2.3 Rasprostranjenost i ugroženost rasa magaraca

Diferencijacija između domaćih životinja uslovlila je pojavu rasa - manje ili više izolovanih populacija koje su predmet sistematske selekcije (FAO, 2011). Industrijalizacija i racionalizacija poljoprivrede usled povećanih zahteva u proizvodnim karakteristikama doveli su do visokog stepena genetičke izolacije i široke zastupljenosti visokoproduktivnih rasa na globalnom nivou, što kao posledicu ima ugrožavanje ili čak izumiranje mnogih dobro adaptiranih lokalnih rasa (FAO, 2011). Ovaj trend je posebno očigledan u ruralnim područjima gde se i lokalna stočarska praksa napušta (Colli i sar., 2013). Navedene promene su globalnog karaktera, a kao njihova najznačajnija posledica je gubitak diverziteta (Stanimirovic i sar., 1999; Rischkowsky i Pilling, 2007; Fornal i sar., 2013). Posledice gubitka genetičke varijabilnosti su opširno dokumentovane i mogu se manifestovati gubitkom vitalnosti, plodnosti i otpornosti na bolesti, kao i čestom pojavom recesivnih naslednih bolesti (Aranguren-Mendez i sar., 2004; Taberlet i sar., 2008). Prema drugom izveštaju o statusu i trendovima životinjskih genetičkih resursa (FAO, 2015) oko 8% registrovanih rasa domaćih životinja je prijavljeno kao izumrlo. Za 22% rasa se smatra da su u opasnosti od izumiranja. Trenutni status za 34% rasa je nepoznat, od kojih se većina gaji u zemljama u razvoju.

Konvencija o biološkom diverzitetu u Riu (1992) obavezala je države potpisnice na očuvanje agrobiodiverziteta. Dodatno, Rimska Deklaracija o svetskoj bezbednosti hrane (1996) promovisala je očuvanje i održivo iskorišćavanje životinjskih genetičkih resursa, nakon čega je usledila analiza stanja životinjskih genetičkih resursa 1999. i 2006. godine. Kao nastavak programa očuvanja genetičkog diverziteta, ali i obezbeđivanja proizvodnih normi u oblastima ishrane i poljoprivrede, približno 40 vrsta domaćih životinja sa preko 8.500 rasa obuhvaćeno je pod nazivom „životinjski genetički resursi“, eng. *Animal Genetic Resources - AnGR* (FAO, 2013).

Tabela 1. Broj i ugroženost rasa sedam vrsta domaćih životinja (FAO, 2015).

Vrsta	Broj zabeleženih rasa	Broj rasa sa nepoznatim informacijama o broju jedinki	Broj ugroženih rasa (endangered)	Broj kritično ugroženih rasa (critical)
Magarac	157	115	11	9
Bivo	123	89	1	3
Goveda	1019	768	67	39
Koze	576	414	39	34
Konj	694	479	67	104
Svinje	543	396	42	26
Ovce	1155	788	86	53
Ukupno	4267	3049	313	268

U izveštaju FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) iz 2006. godine (Rischkowsky i Pilling, 2007) date su informacije o stanju rasa magaraca širom sveta. Navodi se da su magarci najbrojniji u zemljama u razvoju, posebno na Bliskom i Dalekom Istoku. Zemlja sa najbrojnijom populacijom magaraca je Kina. U pomenutom izveštaju se takođe navodi da magarci imaju minimalnu raznovrsnost između rasa u poređenju sa drugim vrstama domaćih životinja. Rase magaraca čine u samo 3% globalno dokumentovanih rasa domaćih životinja. Ukupan broj magaraca u svetu konstantno opada što je i zabeleženo između 1995. i 2000. godine kada je njihov broj sa 43.730 miliona pao na 43.472 miliona. U 2006. broj magaraca je iznosio 41 milion. Međutim, 1995. godine bilo je 77 rasa magaraca zabeleženih na globalnom nivou i broj opisanih rasa se povećavao i u 2000. godini je zavedeno 97 rasa. U popisu rasa magaraca u DAD - IS (FAO) bazi podataka iz 2008. godine zavedeno je 185 rasa u 7 FAO regiona

sveta (Kugler i sar. , 2008; Tabela 2), a danas je broj zavedenih rasa veći i iznosi 191 (DAD – IS, 2016).

Tabela 2. Broj zavedenih rasa magaraca u svetu 2006. i 2014. godine (Rischkowsky i Pilling, 2007; FAO, 2015)

Regija	Broj rasa	
	2006. godina	2014. godine
Afrika	26	20
Azija i Pacifik	32	42
Evropa i Kavkaz	51	50
Latinska Amerika i Karibi	24	24
Bliski i Srednji Istok	47	16
Severna Amerika	5	5
Ukupno	185	157

Ovo povećanje broja zavedenih rasa je posledica skretanja pažnje javnosti na depopulacione trendove rasa magaraca širom sveta. Napori su povećani posebno u Evropi, gde se vršila karakterizacija i zvanično priznavanje mnogih rasa. U ekonomski manje razvijenim regijama sveta postoji daleko veći broj neopisanih rasa magaraca, međutim, smatra se da je broj rasa ipak relativno mali (Kugler i sar., 2008). Nasuprot ruralnim regijama, u Evropi, Severnoj Americi i na Bliskom istoku broj rasa u odnosu na broj životinja je visok. Objašnjenje se može naći u svrsi magarca u ekonomski različitim regionima sveta. U prosperitetnijih regionima gajenje čistih rasa je primarno, dok u siromašnim zemljama magarca koriste uglavnom kao radnu životinju pa su podaci o poreklu često nepoznati.

Većina rasa magaraca je nastala usled geografske izolovanosti i razlike u gajenju i upotrebi (Kugler i sar., 2008). U centralnoj i severnoj Evropi krajem 18. veka je počeo proces tzv. "formiranje rasa" domaćih životinja, koji praktično nije

obuhvatio magarca. Vrsta je već tada bila ekonomski nezanimljiva. U novije vreme usled mehanizacije i automatizacije skoro svih procesa rada u poljoprivredi, transportu i vojsci, magarci i njihovi hibridi (mule i mazge) više nisu potrebni (Colli i sar., 2013). U mnogim zemljama, glavno interesovanje za magarce se svodi na hobističko držanje. Međutim, ova promena prvobitne namene magaraca znači da gotovo i nema čistokrvnog uzgoja magarećih linija i da se sve ređe do njih može doći (Kugler i sar., 2008). Magarci pojedinih rasa postaju retkost pa osnova za uzgoj postaje sve manja. Javljaju se bolesti naslednog karaktera i povećanje stepena inbridinga, koji slabe preostale populacije magaraca. Nestanak različitih rasa dovodi do opasnosti da će kulturne vrednosti takođe biti izgubljene (Kugler i sar., 2008; Rossel i sar., 2008).

Institut za monitoring retkih rasa i semena Evrope je izvršio temeljno istraživanje koje je obuhvatilo obimne literaturne podatke, internet baze podataka ali i direktna ispitivanja nadređenih institucija, odgajivačkih organizacija i fizičkih lica, da bi obezbedili sveobuhvatne informacije vezane za brojnost i ugroženost današnjih rasa magaraca. Prvo istraživanje ovog tipa je sprovedeno 1997. i 1998. godine i od dobijenih podataka stvorena je baza koja je poređena sa podacima iz svetske nadzorne liste za genetičke resurse domaćih životinja (WWL-DAD). Nakon ovih ispitivanja, stanje u odgoju magaraca se značajno promenilo do 2008. godine. U pojedinim zemljama odgajivači magaraca su u međuvremenu napravili zajedničke organizacije i prekogranične matične knjige, dok su i neke do sada neopisane rase magaraca okarakterisane i zvanično priznate (Kugler i sar., 2008). Uopšteno, zainteresovanost javnosti za vrste i rase je povećana. Međutim, broj magaraca u Evropi se i dalje smanjuje i većina rasa ima status ugroženih, posebno u zemljama Južne i Jugoistočne Evrope koje su tradicionalno koristile magarce u poljoprivredi. Institut za monitoring retkih rasa i semena Evrope istraživao je 2000/2001. godine genetičke animalne resurse u Italiji (*Risorse genetiche agrarie in*

Italia) gde je ustanovljeno alarmantno stanje u brojnosti rasa magaraca u Italiji. Naime, šest rasa magaraca je izumrlo (Tabela 3) što predstavlja veliki gubitak za biodiverzitet, jer je, između ostalog, Apeninsko poluostrvo jedna od kolevki uzgoja magaraca u Evropi koja ima tradiciju preko 4.000 godina (Kugler i sar., 2008). Tokom poslednjih nekoliko godina država Italija, odgajivačke organizacije ali i naučna zajednica intenzivno rade na očuvanju preostalih devet rasa (Beretti i sar., 2005; Kugler i sar., 2008).

Trend depopulacije rasa magaraca nije zaobišao ni Balkansko poluostrvo. Na osnovu podataka Ivanković i sar. iz 2000. godine, broj magaraca u Hrvatskoj se smanjio za 80%. Do tada, nisu postojali zvanični podaci o ukupnom broju jedinki i rasa magaraca i njihovim genetičkim karakteristikama.

Tabela 3. Izumrle rase magaraca u Italiji (Kugler i sar., 2008)

Rasa	Teritorija
Cariovili	Abruzze (Aquila)
Castelmorone (Castel Morrone)	Kampania (Caserta)
Emiliano	
Grigio viterbese	Lazio (Viterbo)
Irpinia	Campania (Benevento; Avellino)
Sant' Alberto	Emilia Romagna (Ravenna; Forli)

2.4 Fenotipska i genetička varijabilnost u okviru vrste *E. asinus*

Sve postojeće vrste ekvida su klasifikovane u rod *Equus* koji obuhvata dve srodne linije. U prvu liniju ekvida tzv. „non-caballine“ vrste spadaju afrički divlji magarac (*Equus africanus*), za koga se smatra da predstavlja pretka današnje vrste domaći magarac (*Equus asinus*), azijski divlji magarac (*E. hemionus* i *E. kiang*), kao i tri vrste zebri endemičnih za afrički kontinent. Druga linija (caballine) obuhvata konje (*Equus caballus*) i populacije divljih konja najčešće klasifikovanih pod nazivom *Equus ferus* (Tarpan ili Przewalski konj, *E. przewalskii*) (Vilstrup i sar., 2013).

Afrički divlji magarci (*Equus africanus*) obuhvataju danas dve kritično ugrožene podvrste (Moehlman i sar., 2015 - IUCN, Red List, 2015): nubijskog (*E. a. africanus*) i somalijskog (*E. a. somaliensis*) divljeg magarca. Nubijski magarac ima peščanu boju dlake sa karakterističnom crnom šarom u obliku krsta na ramenom pojasu, belo obojene noge i visinu grebena od 110-122 cm. Za sad još uvek postoji nekoliko stotina somalijskih divljih magaraca i njima akutno pretil izumiranje (<300, IUCN, 2015). Somalijski divlji magarac je svetlo crvene i sivkaste boje, snažne telesne konstitucije, sa visinom grebena od 130-140 cm. Za razliku od nubijskih, oni nemaju rameni krst, ali su prisutne crne pruge na nogama.

Azijski divlji magarci (*Equus hemionus*) ili još nazivani i Onager magarci, imaju različite podvrste koje su živele u stepama zapadno od Urala, Kazahstanu, Turkmenistanu do Mongolije i Kine, a severozapadno, od Mediterana preko Sirije, Iraka do Pakistana i zapadne Indije. Usled ogromne geografske rasprostranjenosti, populacije magarca u različitim oblastima su bile izolovane jedna od druge. Zbog ove izolacije, sada ima pet podvrsta Onager magaraca: *E. h. hemionus* (Mongolija i Severna Kina), *E. h. kulan* (Turkmenistan), *Equus h. onager* (persijski Onager), *E. h. khur* (Zapadna Indija) i *E. h. eohippus* (Sirija, izumro 1929. godine).

Mule i mazge nastaju parenjem konja i magarca i predstavljaju „najuspešnije“ hibride u porodici ekvida. Uzgoj mule je počeo u 3. veku pre nove ere u Mesopotamiji i Anadoliji kada su se konji širili sa severa, a magarci sa juga i tada su bili držani i odgajani zajedno po prvi put. Mule i mazge kombinuju vrline magaraca i konja. Oni su jači od magaraca, ali manje temperamentni, a otporniji na bolesti nego konji. Parenjem konja i magaraca javlja se efekat unapređenja kod hibrida poznat kao hibridni vigor (heterozis): potomci su zdraviji, sa dužim životnim vekom i poseduju veću izdržljivost nego njihovi roditelji. Mule su hibridi nastali parenjem kobile sa magarcem. Izgledom podsećaju više na konja nego na magarca. Ovo je jedan od razloga postojanja većeg broja mula od mazgi koje nasuprot mulama, nastaju parenjem magarice sa pastuvom, više podsećaju na magarca i obično su sitnije građe od mula. Dodatno, odgajivači su radije gajili mužjake nego ženke magaraca, jer je uglavnom lakše upariti magarca sa kobilom, nego pastuva sa magaricom. Karakteristično za hibride je da su muški potomci sterilni, dok ženke u ređim slučajevima mogu biti fertile.

2.5 Značaj fenotipske karakterizacije

Procesom domestikacije, koja je započeta za različite životinjske vrste pre oko 30.000 godina, dobijen je današnji genetički diverzitet domaćih životinja. Kroz istoriju, malobrojne rase odomaćenih vrsta životinja korišćene su za transport i ishranu ljudi tokom migracija (Kimura i sar., 2013; Rosenbom i sar., 2014). Međutim, lokalna adaptacija, selekcija, mutacija i genetički drift dovele su do promena genetičkog diverziteta i uslovile današnju široku paletu razlika u fenotipu i genotipu domaćih životinja.

U cilju očuvanja postojećih rasa i donošenja pravovremenih odluka u razvoju stočarstva i odgajivačkim programima, FAO je formirao strateški prioritetne oblasti u okviru Globalnog akcionog plana, a to su: uvid u brojno

stanje, karakterizacija i praćenje genetičke varijabilnosti kod domaćih životinja. Rasa je operativna jedinica u procesima očuvanja genetičkih resursa (FAO, 2011). Nedostatak informacija o genetičkim karakteristikama lokalnih, autohtonih rasa predstavlja otežavajuću okolnost za njihovo uvođenje u odgajivačke programe. Karakterizacije rasa kako na nivou fenotipa i njihove interakcije u proizvodnim sistemima, tako i na genetičkom nivou, od izuzetnog su značaja za njihov opstanak (FAO, 2011).

Fenotipska karakterizacija životinjskih genetičkih resursa ima zadatak da sistematski dokumentuje uočene morfološke i fiziološke karakteristike, geografsku distribuciju, proizvodna okruženja i upotrebu tih resursa. Informacije dobijene iz studija karakterizacije su od suštinskog značaja za planiranje upravljanja AnGR na lokalnom, nacionalnom, regionalnom i globalnom nivou (FAO, 2011). Procenu diverziteta AnGR otežava postojanje mnogih populacija životinja čija rasna pripadnost još uvek nije definisana i takve populacije su mogle nastati ukrštanjem postojećih rasa. Međutim, neke životinje mogu pripadati relativno homogenim grupama koje se razlikuju od drugih populacija na osnovu prepoznatljivih i stabilnih fenotipskih karakteristika (među kojima mogu biti jedinstvene i vredne osobine) koje ih mogu klasifikovati kao zasebnu rasu (Lenstra i sar., 2012). Prema tome, jedan od ciljeva fenotipske karakterizacije je determinacija stepena varijabilnosti među populacijama jedne rase i stanja ugroženosti životinjskih resursa. Fenotipska karakterizacija je, dakle, od fundamentalnog značaja za održavanje brojnosti, uspostavljanje ranog upozorenja i sistema za reagovanje u slučaju ugroženosti životinjskih genetičkih resursa (FAO, 2011).

Termin "fenotipska karakterizacija AnGR" se koristi da označi proces utvrđivanja jasnih populacija određene rase pri čemu se opisuju njihove morfološke i fiziološke karakteristike ali i osobenosti njihovih proizvodnih okruženja. U tom kontekstu, izraz "proizvodno okruženje" obuhvata ne samo

"prirodno" okruženje već odgajivačku praksu i radne sposobnosti životinjske populacije, kao i socijalne i ekonomske faktore (FAO, 2011). Utvrđivanje geografske distribucije populacija je sastavni deo fenotipske karakterizacije. Dalja istraživanja u cilju determinacije genetičke osnove opisanih fenotipskih osobina, njihovog šablona nasleđivanja i uspostavljanja odnose između rasa spadaju u proces molekularno-genetičke karakterizacije (FAO, 2011). Svrha fenotipske i molekularno-genetičke karakterizacije životinjskih genetičkih resursa jeste merenje i opis genetičke raznovrsnosti kao osnove za njihovo razumevanje i samoodrživo korišćenje.

Prema uputstvu FAO (2011), za proučavanje fenotipske karakterizacije neophodni su sledeći podaci:

- geografska distribucija rase, njena veličina i struktura populacije;
- fenotipske osobine rase koje uključuju i morfološke i fiziološke karakteristike, eksterijer, ekonomski iskoristljive osobine (npr. rast, reprodukcija i proizvodi; odnos prinos - kvalitet);
- reprezentativne slike zrelih jedinki oba pola, kao i stada ili jata u njihovom tipičnom okruženju;
- informacije o poreklu i razvoju rasa;
- ako postoje, fenotipske i genetičke veze sa drugim rasama unutar ili van zemlje;
- Prirodno i odgajivačko okruženje u kojem se gaje rase; odgovor rasa na stresogene faktore iz životne sredine kao što su bolesti i paraziti, ekstremni vremenski uslovi i loša ishrana;
- relevantna autohtona znanja i tradicionalne odgajivačke strategije upravljanja koje koriste zajednice.

2.5.1 Fenotipska karakterizacije rasa u okviru vrste magarac

Zbog razlika u odgajivačkom menadžmentu, geografskom području i klimatskim uslovima, mnoge morfološke razlike se mogu naći kod različitih vrsta i rasa životinja. Sistematski okarakterisane rase magaraca su retke. Često, čak i za rase magaraca za koje postoje određeni podaci, oni nisu tačno definisani, za razliku od drugih vrsta domaćih životinja (Kugler i sar., 2008). Mali je broj podataka i istraživanja vezanih za morfometrijske parametre kod magaraca. Za veliku populaciju magaraca u Velikoj Britaniji, French i Patrick su 1995. godine izvršili analizu fizioloških, hematoloških i biohemijskih parametara u cilju postavljanja referentnih vrednosti. U nagloj depopulaciji evropskih rasa magarca krajem 20. veka, kada je ukupan broj magaraca opao za 80% (Aranguren-Mendez i sar., 2001), među ugroženim rasama je bio i katalonski magarac. Može se reći da je studija Folch i Jordana (1997) jedna od prvih koja je dala detaljni prikaz morfometrijskih karakteristika katalonskog magarca, kao inicijalni korak u očuvanju rase, a u skladu sa preporukama FAO.

Slična situacija u istom periodu bila je i u Hrvatskoj. Naime, neznatan istraživački interes za magarce tokom proteklih dvadeset godina rezultirao je malim brojem naučnih studija o rasama i populacijama magaraca na Balkanu, pa tako i o dinamici promena u subpopulacijama. Ivanković i sar. 2000. godine vrše prva fenotipska istraživanja na 270 magaraca u u Hrvatskoj. Za ispitivane magarce uzimani su opšti podaci o poreklu i starosti, jedinke su fotografisane i izmereno je 11 telesnih mera. Rezultati istraživanja ukazuju na podelu populacije magaraca u Hrvatskoj na tri tipa: primorsko-dinarski, severno-jadranski i istarski. Navedeni tipovi značajno se razlikuju u visini grebena, obimu grudi i cevanice, ali i u većini ostalih istraživanih telesnih mera. Podela tipova magaraca na osnovu istraživanja fenotipskih karakteristika podržala je prethodne rezultate analiza polimorfni proteina u krvi i DNK (Ivanković i sar., 1998; Ivankovic i Caput, 1999). Pored

fenotipske karakterizacije hrvatskih magaraca, na Balkanu je do sada objavljena još jedna deskriptivna analiza albanskih magaraca (Papa i Kume, 2012) koja je na osnovu morfometrijskih podataka podelila populaciju magaraca prema regionu koji naseljavaju i to na magarce niskih predela, brdovitih i planinskih regiona.

Pored Kine, Etiopija poseduje najveću populaciju magaraca u svetu (Gebrevold i sar., 2004). Dodatno, Etiopija je jedno od strateški najznačajnijih zemalja vezanih za diverzitet domaćih magaraca u severoistočnoj Africi (Kefena i sar., 2011). U svojoj knjizi koja se bavila poreklom domaćih životinja u Africi (Epstein, 1971), Epstein je ukazao na to da populacija magaraca u Etiopiji pokazuje značajne konformacijske razlike i ima različite varijacije u boji dlake i veličini tela. Na osnovu navedenih činjenica, Kefena i sar. (2011) su izvršili morfološku karakterizaciju i identifikovanje geografske distribucije populacija domaćih magaraca u Etiopiji. Korišćeno je 12 morfometrijskih parametara na ukupno 569 odraslih magaraca (289 mužjaka i 280 ženki) koji su naseljavali različite ekološke niše širom teritorije Etiopije. Istraživanjem su obuhvaćene nove populacije magaraca ali i one koje su prethodno identifikovane, a na osnovu dobijenih podataka potvrđeno je postojanje 6 različitih populacija magaraca, dok je jedna populacija odbačena kao zaseban entitet.

Pored morfometrijskih podataka, utvrđivanje hematoloških i biohemijskih vrednosti krvi je od velikog značaja za karakterizaciju rase i praćenje zdravstvenog stanja. U dosadašnjoj kliničkoj praksi veterinara, većina potrebnih informacija o fiziološkim parametrima magaraca je preuzeta od postojećih vrednosti za konje, koji često nisu adekvatni (Girardi i sar., 2014). Iako pripadaju istoj porodici (Equidae) i istom rodu (*Equus*), konji i magarci pokazuju veoma različite hematološke i biohemijske vrednosti krvi (de Oliveira i sar., 1983). Poznavanje hematoloških vrednosti i biohemijskih parametara krvi omogućava uvid u metabolički status jedinke i krda, kliničku sliku i sistemske efekte bolesti,

odgovor na terapiju, itd. (Folch i sar., 1997; Jordana i sar., 1998; Mori i sar., 2003; Dugat i sar., 2010; Alberghina i sar., 2012; Girardi i sar., 2014).

Prvo opsežno istraživanje na populaciji magaraca na severnoameričkom kontinentu u cilju dobijanja vrednosti odabranih krvnih parametara obavili su Zinkl i sar. (1990) a nedugo zatim istraživanja sa istim ciljem sprovedena su u Velikoj Britaniji (French i Patrick, 1995). U Španiji, prateći preporuke FAO u cilju karakterizacije i očuvanja ugrožene rase katalonski magarac, obavljena su ispitivanja u cilju definisanja referentnih hematoloških (Folch i sar., 1997) i biohemijskih vrednosti krvi (Jordana i sar., 1998) kao i uticaj starosti i pola jedinki na navedene vrednosti. Za određivanje referentnih vrednosti hematoloških parametara katalonskog magarca, Folch i sar. (1997) su ispitali 45 odraslih ženki i 26 odraslih mužjaka starijih od 3 godine, kao i 27 jedinki oba pola mlađih od 3 godine. Godine starosti ispitivanih magaraca pokazale su najviše uticaja na hematološke parametre, i to za 9 od 16 ispitivanih vrednosti. Za istu ispitivanu populaciju, Jordana i sar. (1998) su utvrdili referentne biohemijske vrednosti krvi i pokazali da se vrednosti fosfolipidne transferaze značajno razlikuju između dva pola kod zrelih magaraca. Razlike u odnosu na starosne grupe su bile za koncentracije neorganskog fosfora, albumina i triglicerida u krvi.

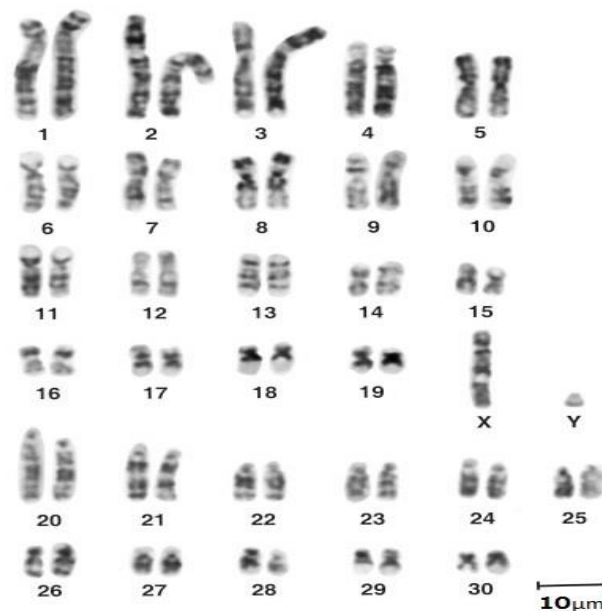
Biohemijski profili brazilskih rasa magaraca nisu postojali, a vrednosti postojećih parametara određenih kod magaraca sa drugih kontinenata se ne mogu u potpunosti primeniti na uslove klime Južne Amerike, jer postoje razlike pod uticajem rase, životne sredine i odgajivačkog programa (Mori i sar., 2003; Girardi i sar., 2014). Poslednje studije hematoloških, biohemijskih i proteinskih parametara krvi i seruma kod italijanske rase ragusana (Caldin i sar., 2005; Alberghina i sar., 2013), magaraca iz Burkine Faso (Sow i sar., 2012), populacije magaraca u SAD (Dugat i sar., 2010), etiopskih (Tesfaye i sar., 2014) i nigerijskih (Yakubu i Chafe, 2008) magaraca su pokazala da se vrednosti ovih parametara kreću u opsegu

postojećih referentnih vrednosti za magarce, sa odstupanjima između starosnih kategorija unutar rasa, kao i kod onih životinja korišćenih za svakodnevni intenzivni rad. Novije studije ispitivanja krvi i seruma kod magaraca bave se utvrđivanjem fizioloških parametara krvi kod novorođenih puladi. Među prvim studijama ovog tipa (D'Alessandro i sar., 2012) ispitivani su serumski parametri energetskog (glukoza, holesterola, trigliceridi) i proteinskog (ukupni proteini, urea, albumin, kreatinin) metabolizma, kao i metabolički profil jetrinih enzima 12, 36, 60, 84, 108 časova i 11 dana posle porođaja. Istraživanje je obuhvatilo 10 puladi ugrožene Martina Franca rase koja se gaji u prirodnim uslovima u južnoj Italiji. Podatke za pulad rase Martina Franca upotpunilo je istraživanje Veronesi i sar. (2014) gde je pored hematološki i biohemijskih vrednosti, utvrđen i sastav gasova venske krvi u prvih 24 časa nakon rađanja. Postoje i hematološki i biohemijski podaci za pulad rase amiata magaraca starosti do 2 meseca (Sgorbini i sar., 2013) čime su obezbeđeni značajni podaci za monitoring tek rođenih jedinki ove rase.

2.6 Organizacija genoma vrste magarac

Uprkos značaju magarca kao vrste i podizanja naučne zainteresovanosti vezane za ovu vrstu, postoji mali broj istraživanja na nivou kariotipa i homologije hromozoma domaćeg magarca ili na molekularnom nivou (DNK markeri). Zbog aktuelnije tematike, napredne istraživačke aktivnosti i genetičkih podataka neophodnih za konja, jasno je da većina radova koji istražuju genom, gene ili DNK markere kod magaraca u izvesnoj meri predstavljaju sporedne aktivnosti ili su povezani sa srodnim istragama koje su uključivale konje (Wade i sar., 2009; Doan i sar., 2012; McCue i sar., 2012). To je moguće zato što su ove dve vrste (*E. caballus* i *E. asinus*) na genetičkom nivou vrlo slične, uprkos različitom broju hromozoma i pojedinim razlikama u genomu koje su identifikovane uporednim mapiranjem i analizom hromozoma (Raudsepp i Chowdhary, 1999; Raudsepp i sar., 2000; Yang i

sar., 2004; Huang i sar., 2015). Ovo potvrđuje i činjenica da ukrštanjem ove dve vrste nastaju vitalni hibridi (mule i mazge) koji su u nekim slučajevima i fertilni (Ryder i sar., 1985; Rong i sar., 1988; Henry i sar., 1995). Utvrđivanjem primarnog redosleda nukleotida u genomu magaraca sekvenciranjem nove generacije (Next Generation Sequencing - NGS) (Bertolini i sar., 2015), utvrđena je veličina genoma magarca od 2.36Gb (Gb - giga baznih parova), koja je neznatno manja od konja (2.37Gb, Wade i sar., 2009). Genom magarca se sastoji iz $2n=62$ hromozoma, 30 parova autozomalnih i jednog para polnih hromozoma (Slika 5). Važno je istaći da rod *Equus* danas obuhvata 8 vrsta (*Equus ferus caballus*, *Equus ferus przewalskii*, *Equus africanus*, *Equus hemionus*, *Equus kiang*, *Equus quagga*, *Equus zebra*, *Equus capensis*) i da broj hromozoma kod ovih vrsta varira od $2n=32$ kod hartmanove planinske zebre do $2n=102$ kod mongolskih i transkapijskih divljih rasa magaraca (Chowdhary i Raudsepp, 2000).

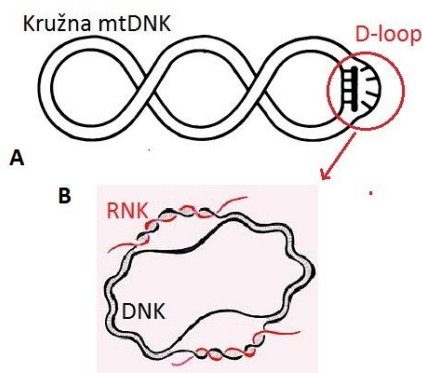


Slika 5. Kariotip magarca (*Equus asinus*) muškog pola (Raudsepp i sar., 2000).

Autozomalni hromozomi magarca se na osnovu svoje morfologije mogu podeliti u dve grupe, gde prvu grupu čini 19 parova meta- i submetacentričnih hromozoma, a drugu preostalih 11 parova akrocentričnih hromozoma (Ryder i sar., 1978; Raudsepp i sar., 2002; Di Meo i sar., 2009).

Kružni mitohondrijski genom (mtDNK) se nalazi u mitohondrijama, organelama koje su odgovorne za procese ćelijskog disanja, tj. proizvodnju energije putem oksidativne fosforilacije. MtDNK je kružne strukture, nema rekombinacija, i odlikuje se sistemom kodiranja sličnim bakterijama (Margulis, 1981). Proučavanjem evolutivnih procesa na nivou genoma sisarskih ćelija, ustanovljeno je da se veliki broj mtDNK gena nalazi u jedarnom genomu. Ovakav "transfer" gena se objašnjava efikasnijem funkcionisanju mitohondrija zbog sve većih energetske zahteva ćelije (Bensasson i sar., 2001).

Mitohondrijski genom magarca je dužine 16.670 bp (Xu i sar., 1996). Ova dužina nije apsolutna zbog varijacije u broju baznih parova kod dve vrste ponovaka kontrolnog regiona (5'-CACACCCA i 5'-TGCGCGCA). Kod mtDNK se na osnovu sastava nukleotida razlikuju teški lanac (eng. *Heavy*, H-lanac) i laki lanac (eng. *Light*, L-lanac) pri čemu teški lanac ima veći procenat zastupljenosti guanina (G) i timina (T) a samim tim i veću težinu i broj gena (Fernandez-Silva i sar., 2003). Zastupljenost baza u L-lancu mtDNK magaraca je sledeća: A, 32.4%; C, 28.9%; G, 13.2%; T, 25.5%. Svi peptid-kodirajući geni imaju metionin kao start kodon, osim NADH5 gena (nikotinamid adenin dinukleotid dehidrogenaza, subjedinica 5) gde je ATT (izoleucin) start kodon. ATT je neuobičajen start kodon kod sisara, i zajednički je za magarce i konje. U okviru mtDNK razlikuju se dva regiona: kontrolni region koji ima regulatornu ulogu i kodirajući region koji sadrži gene. Kontrolni region se naziva još i D-loop region (eng. displacement loop - izmeštena petlja) koja se sastoji od dva dvolančana lanca DNK koje drži odvojenim treći lanac DNK (Slika 6).



Slika 6. A - Šematski prikaz mtDNK sa D-loop regionom (preuređeno iz Kamatsu i sar., 1971) **B** - Šematski prikaz formiranja D-loop regiona tokom transkripcije RNK, pri čemu je dvostruka helikoidna struktura oba DNK lanaca izostavljena (Wikipedia, The Free Encyclopedia. 2016, <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=D-loop&oldid=750989224>)

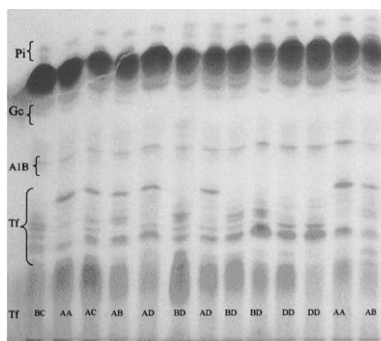
Kao i kod konja, i kod magarca postoji 13 peptid kodirajućih gena: CO I, II, III; NADH 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6; Cytb; ATPase 6, 8 (Xu i sar., 1996). Kontrolni region predstavlja nekodirajući deo mtDNK veličine 1207 bp (Xu i sar., 1996). U sastavu kontrolnog regiona, nalazi se hipervarijabilni HVR1 region veličine 479bp koji se nalazi između 15386-15865 pozicije nukleotida mtDNK (pozicije na osnovu GenBank reference magarca X97337, Xu i sar., 1996).

2.7 Genetički markeri

Genetički markeri su segmenti DNK sa poznatom lokacijom na homozomu koji pokazuju genetičke razlike između pojedinih organizama ili vrsta i čije se nasleđivanje može pratiti. Prema Jones i sar. (1997), postoje tri glavne vrste genetičkih markera: (1) morfološki ("klasični" ili "vidljivi") markeri koji predstavljaju samo fenotipske osobine; (2) biohemijski markeri, u koje spadaju alelske varijante enzima (izozimi ili allozimi) i (3) DNK (molekularni) markeri. Prvu genetičku mapu *Drosophila melanogaster* je prikazao Sturtevant (1913) koristeći fenotipske (morfološke) markere. Od tada do upotrebe molekularno-genetičkih metoda, morfološki markeri su se uglavnom koristili za fenotipsku karakterizaciju biljaka i životinja (Collard i sar., 2005).

2.7.1 Proteinski markeri

Polimorfizmi proteina se u literaturi navode kao prvi pravi molekularni markeri (Schlötterer, 2004), a nazivaju se još i alozimi (allozymes - "*allelic variants of enzymes*"). Standardne tehnike za proučavanje i dokazivanje genetičke varijabilnosti na nivou proteina su različite elektroforetske tehnike, a najčešće korišćena je elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (Slika 7).



Slika 7. Proteini plazme magarca nakon razdvajanja putem jednodimenzionalne gel-elektroforeze (PAGE, 12%) sa Coomassie Brilliant Blue G 250 bojenjem (Jordana i sar., 1999).

Polimorfizam enzima se analizira na osnovu razlika u veličini i naelektrisanju unutar proteinskih struktura usled aminokiselinskih supstitucija. Rane studije utvrđivanja polimorfizma proteina kod ljudi i *Drosophila* pokazale su značajan stepen varijabilnosti u ispitivanim populacijama (Hubby i Lewontin, 1966). Nalaz visokog unutarpopulacijskog polimorfizma doveo je do stvaranja neutralne teorije molekularne evolucije i stava da je većina mutacija neutralna, tj. bez efekta (Kimura, 1968; King i Jukes, 1969). Ovakav koncept predstavlja jedno od najvećih nasleđa alozimskog marker sistema. Od tada, alozimi se koriste kao markeri izbora kod velikog broja životinja. U studijama genetičke karakterizacije konja najčešće korišćeni proteinski markeri su hemoglobini (Ashton, 1958; Braend i Efremov, 1965), albumini (Stromont i Suzuki, 1963; Braend, 1964; Gahne, 1966) i holinesteraze (Oki i sar., 1964). Osim ispitivanja vezanih za karboksilnu esterazu u serumu konja, magaraca i njihovih hibrida (Kaminski i Gajos, 1964) malo je podataka o karakterizaciji magaraca na osnovu proteinskih markera (Ivankovic i Caput, 1999). Jordana i sar. (1999) su izvršili genetičku karakterizaciju ugroženog katalonskog magarca na osnovu mikrosatelitnih i proteinskih markera. Kao proteinski markeri su korišćeni 6-fosfoglukonat dehidrogenaza, glukofosfat

izomeraza, albumin, transferrin, vitamin D vezujući protein, α 1b glikoprotein i inhibitor proteaze.

Upotreba polimorfnih proteinskih sistema kao klasičnih genetičkih markera je pokazala izvesna ograničenja. Nakon uvođenja i standardizovanja metodologije upotrebe alozimskog marker sistema, dalji razvoj u smeru otkrivanja novih tipova markera i povećanja ukupnog broja markera različitih tipova nije bio moguć. Dodatno, ključni nedostatak proteina kao klasičnih genetičkih markera jeste da se ispitivanjem ovih markera otkriva samo mali deo realne varijacije u sekvenci DNK. Nasuprot proteinskim markerima, molekularni markeri omogućavaju detekciju praktično svih varijacija u sekvenci DNK i ne samo da su prevazišli ograničenja prethodno korišćenih markera, nego poseduju i jedinstvena genetička svojstva koja ih čine mnogo korisnijim od ostalih genetičkih markera (što je detaljno opisano u sledećem poglavlju). Osim toga, kod molekularno genetičkih DNK markera postoji kontinuiran razvoj.

2.7.2 DNK markeri

Molekularni markeri (DNK markeri) predstavljaju delove DNK koji su locirani na određenom delu genoma, a danas su našli široku upotrebu u dijagnostici, molekularnoj biologiji i biotehnologiji (dijagnostika naslednih bolesti, detekcija i tipizacija patogena, determinacija pola ptica i sisara, provera roditeljstva i verifikacija pedigrea, forenzičke analiza, itd.). Korišćenjem DNK markera mogu se detektovati tzv. "tihe" (engl. *silent*) mutacije, tj. varijacije koje se ne ispoljavaju u fenotipu, odnosno, nemaju fenotipski efekat ili njihov fenotipski efekat nema uticaja na adaptivnu vrednost jedinki. DNK markeri imaju veliku prednost nad morfološkim markerima, zato što su brojniji i ne remete fiziologiju organizma (Jones i sar., 1997).

Tri kategorije DNK markera se mogu razlikovati na osnovu njihove lokalizacije i različitim opsegom upotrebe (Tabela 4): (i) maternalni mtDNK

markeri (koji se prenose sa majke na potomstvo, imaju visok nivo varijabilnosti i omogućavaju uvid u filogeniju vrste); (II) polno vezani markeri - X i Y hromozomski haplotipovi kod sisara i Z- i W- markeri kod ptica i (III) nuklearni autozomalni markeri koji su najuže povezani sa fenotipom (Lenstra i sar., 2012).

Tabela 4. Kategorije DNK markera, njihov tip nasleđivanja i upotreba.

Marker	Tip nasleđivanja	Upotreba
Autozomalni	Mendelov tip (biparentalno)	Individualna identifikacija; analiza pedigreea; određivanje parametara genetičkog diverziteta i genetičke strukture populacija; stepen inbridinga, adaptacije i selekcije
mtDNK	Maternalno	Filogenetske analize (određivanje predačkih vrsta); Filogeografske analize (mesta porekla i pripitomljavanja); Efektivna veličina populacije, ekspanzije, uska grla; Međupopulacijske genetičke distance, varijacije između transkontinentalnih populacija
Y-hromozom	Paternalno	Filogenetičke i filogeografske analize; Poreklo priplodnih ženki

U nuklearne autozomalne markere spadaju: nasumična amplifikacija polimorfne DNK (RAPDs (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata (AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*), minisateliti, mikrosateliti (SSRs - *Single Sequence Repeats*), polimorfizam pojedinačnih nukleotida ili tačkasti

polimorfizam (SNP- *Single Nucleotide Polymorphism*) i insercije/delecije (indels). Razvoj tehnike lančane reakcije polimeraze (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) koja omogućava amplifikaciju određenih sekvenci DNK do koncentracija koje se lako mogu detektovati i analizirati, doveo je do mogućnosti analize varijabilnosti DNK genetičkih markera kao metoda ključnih u studijama genotipizacije različitih vrsta (Lenstra i sar., 2012). Molekularne tehnike koje će se koristiti pri genotipizaciji se prilagođavaju tipu promena na DNK (varijacija) koje se detektuju kao i planiranom protoku i obradi dobijenih podataka.

Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (RFLP). Otrkiće i izolacija enzima restrikcione endonukleaze 1960. godine od strane Arber, Smith i Nathan, postavilo je osnovu za uvođenje nove vrste genetičkih markera: polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) (Botstein i sar., 1980). Korišćenjem RFLP, DNK uzorak se pomoću restrikcionih enzima cepa na specifičnom mestu, a gel elektroforezom se razdvajaju restrikcioni fragmenti različitih dužina. Na ovaj način se mogu detektovati promene na DNK u vidu substitucije jedne baze u mestu sečenja enzima, što je dozvolilo po prvi put analizu nekodirajućih sekvenci i tihih ("silent") promena u kodirajućim sekvencama. RFLP je prva tehnika korišćena u izradi DNK profila, mapiranju genoma, lociranju gena genetičkih poremećaja, procenu rizika pojave naslednih bolesti i testiranje roditeljstva (Kerem i sar., 1989). Usled tehničkih nedostataka koji se vezuju za postupke hibridizacije i uspona tehnologija jeftinog sekvenciranja DNK, RFLP markeri nisu dalje eksploatisani (Schlötterer, 2004).

Minisateliti. Minisateliti se definišu kao ponavljajuće, tandemske i kratke (6- do 100bp) sekvence DNK. Prvi minisateliti su opisani pre 20 godina u humanom genomu (Whyman i White, 1980), a slične DNK strukture su zatim pronađene u genomima mnogih organizama uključujući i bakterije. Zbog polimorfizma u dužini minisatelita koja proizilazi iz varijacija u broju ponavljanja,

kao i mogućnosti da neki od ponovaka unakrsno hibridizuju sa desetinama drugih sličnih lokusa širom genoma, minisateliti su otvorili put za individualnu identifikaciju analizom DNK (Jeffreis i sar., 1985). Izuzetno visok polimorfizam minisatelita stvorio je novi pravac u genetičkoj individualnoj identifikaciji uvodeći tehniku zvanu "DNK fingerprinting" (Jeffreis i sar., 1985). Uprkos visokom polimorfizmu i uspešnoj primeni u forenzici i verifikaciji roditeljstva, minisateliti nisu našli svoju široku primenu u populacionoj genetici i mapiranju genoma. Minisateliti imaju kompleksan šablon lokalizacije na DNK pri čemu je sprečeno i/ili otežano utvrđivanje dužine alela za dati lokus, stoga, standardne populaciono-genetičke analize nisu obavljane na osnovu podataka dobijenih analizom minisatelita (Schlötterer, 2004).

Mikrosateliti. Mikrosateliti su specifične strukture u genomu koje se sastoje od varijabilnog, repetitivnog motiva (1-6 bp) koji se ponavlja uzastopno određen broj puta, i bočnih, konzervativnih (flanking) regiona koji retko podležu mutacijama (Kelkar i sar., 2010). Ponavljajuće sekvence u zavisnosti od dužine motiva mogu biti mono-, di-, tri-, tetra- penta- i heksanukleotidi (Slika 8). U literaturi, mikrosateliti se označavaju kao kratki tandemski ponovci (*Short Tandem Repeats - STRs*), jednostavne ponavljajuće sekvence (*Simple Sequence Repeats - SSRs*) ili varijabilni u broju tandemski ponovci (*Variable Number Tandem Repeats, VNTR*). Mikrosateliti se uglavnom klasifikuju kao neutralni genetički markeri, tj. nalaze se u nekodirajućim regionima genoma (intergenskim sekvencama i intronima) i smatra se da nisu pod uticajem selekcije, odnosno, da njihova frekvencija i distribucija reflektuju isključivo mutacione procese. Ustanovljeno da su mikrosateliti ponekad prisutni u kodirajućim sekvencama DNK, pa tad mogu imati izvesnog uticaja na regulaciju ekspresije gena, na adaptibilnost u različitim uslovima u okruženju, i u takvim slučajevima mogu biti podložni selekciji (Kelkar i sar., 2010). U molekularno-genetičkim studijama, koriste se upravo mikrosateliti

lanac DNK. Prilikom izvođenja *in vitro* eksperimenata ovakav tip proklizavanja se dešavao često tokom replikacije (Ellegren, 2004; Webster i Hagberg, 2007; Brandstrom i Ellegren, 2008; Kelkar i sar., 2008), dok je stvarna *in vivo* učestalost mutacija mikrosatelitske DNK niža. Razlika u učestalosti mutacija u *in vitro* i *in vivo* uslovima objašnjava se prisustvom korektivnih mehanizama za ispravku pogrešno sparenih baza ("*mismatch*" korektivni sistem) koji redukuje stopu mutacija mikrosatelita 100 do 1000 puta. Na osnovu navedenog možemo zaključiti da je učestalost mutacija mikrosatelita rezultat dva procesa: učestalosti "proklizavanja" tokom replikacije DNK i efikasnosti mehanizama za ispravku pogrešno sparenih baza (Schlötterer, 2004). Primarni nastanak mikrosatelita pripisuje se kratkim "proto"-mikrosatelitima koji nastaju slučajnim tačkastim mutacijama, nakon čega već pomenutim fenomenom "proklizavanja" tokom replikacije dolazi do njihove ekstenzije (Schlötterer, 2004). Modelom nejednakog krosing-overa je objašnjeno nastajanje većih promena u broju ponovaka mikrosatelita, gde dolazi do različite podele ponovaka između hromozoma. Navedenim modelima nastaju uglavnom neutralne promene bez fenotipske ekspresije, osim u retkim slučajevima kada su mikrosateliti u kodirajućim regionima DNK.

Varijabilnost ispitivane populacije direktno zavisi od brzine nastanka mutacija tj. od stope mutacija. Da bi se stopa mutacija odredila, mora se uzeti u obzir dužina mikrosatelita kao značajan faktor. Studije bazirane na analizi pedigrea, kloniranju mikrosatelita i populaciono-genetičkim podacima ukazuju na to da učestalost mutacija mikrosatelita raste sa povećanjem broja ponovljenih motiva (Schlötterer, 2000; Kelkar i sar., 2008). Međutim, još uvek nije ustanovljeno da li porast stope mutacija linearno prati porast broja ponovljenih motiva. Redosled nukleotida u ponovcima motiva, sekvence DNK koje ovičavaju lokus mikrosatelita i stopa rekombinacije takođe su među faktorima za koje je

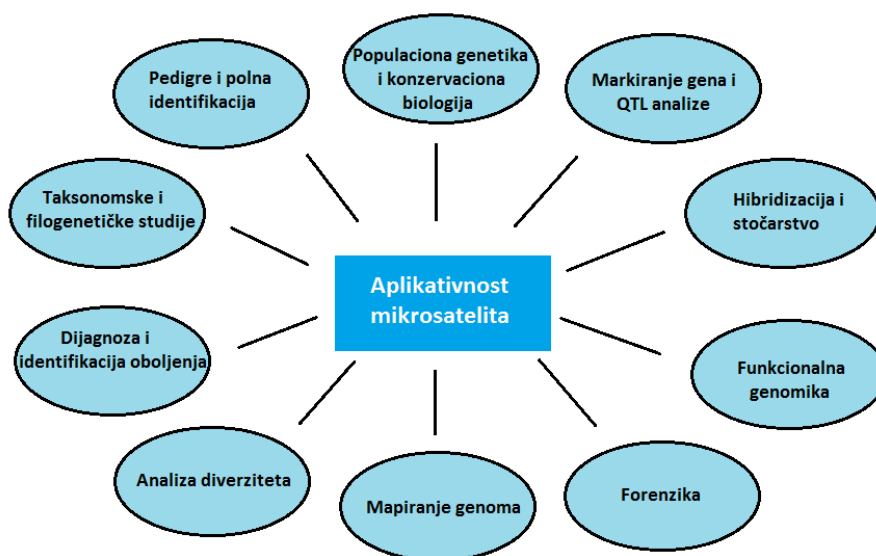
pokazano da mogu imati uticaja na razlike u evolucionoj dinamici različitih mikrosatelita (Schlötterer, 2004).

Za povećanje i smanjenje broja ponovaka kod mikrosatelita postoji veliki broj predloženih modela evolucije, među kojima se izdvajaju tri kao najprihvatljivija:

- 1) *Infinite Allele Model* (IAM) - od alela sa određenim brojem ponovaka može nastati alel sa bilo kojim brojem ponovaka;
- 2) *Stepwise Mutation Model* (SMM) - od alela sa određenim brojem ponovaka može nastati samo alel koji sadrži +/- 1 broj ponovaka;
- 3) *Two-Phase Mutation Model* (TPM) - novi aleli nastaju uglavnom putem SMM, ali mogu povremeno nastati i putem IAM; za ovaj model važi da najrealnije prikazuje evoluciju mikrosatelita.

Nakon otkrića više polimorfnih nuklearnih mikrosatelita 1989. godine, sa mogućnošću PCR-amplifikacije i visokom stopom mutacija $10^3 - 10^4$ po generaciji (Ellegren, 2000; Whittaker i sar., 2003), mikrosateliti su postali najčešće korišćeni autozomalni markeri u populaciono-genetičkim studijama (Slika 9), forenzici, mapiranju genoma i dr. (Bruford i sar., 2003; Schlötterer, 2004). Glavne prednosti mikrosatelitskih markera su kodominantnost (mogu se razlikovati heterozigoti od homozigota), visoka specifičnost, polimorfnost i hipervarijabilnost, visok informativni sadržaj, visoka uniformna zastupljenost u celom genomu, visoka stopa mutacije i laka dostupnost i priprema uzoraka za analizu, mogućnost automatizacije i paralelne primene (Abdul-Muneer, 2014). Priprema uzoraka za analizu mikrosatelita obuhvata izolaciju DNK i PCR amplifikaciju ciljnih lokusa mikrosatelita korišćenjem prajmera za sekvence DNK koje ograničavaju dati lokus. Procena dužine dobijenih PCR produkata vrši se kapilarnom elektorforezom korišćenjem automatizovanih DNK sekvencera i uređaja baziranih na detekciji fluorescencije. Nedostaci mikrosatelita kao genetičkih markera su

pojave heterogenih modela mutacija, koje kao što je prethodno navedeno, otežavaju tumačenje rezultata. Osim navedenih promena, može se javiti heteroplazmija kao i greške u samoj genotipizaciji u koje spadaju nespecifični produkti amplifikacije, dominacija kratkih alela, lažnih alela (stutter peaks) i dr. (Abdul-Muneer, 2014).



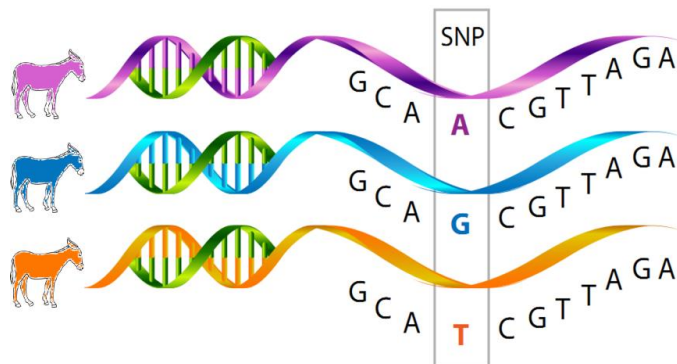
Slika 9. Aplikativnost mikrosatelita u različitim oblastima (preuređeno iz Abdul-Muneer, 2014).

Mikrosateliti su prisutni u velikom broju u genomu svih sisara (Lenstra i sar., 2012). Naime, jedan od pozitivnih aspekata korišćenja mikrosatelita je činjenica da se ovi markeri mogu lako amplifikovati kod srodnih taksona i na taj način se mogu široko i uspešno primeniti u studijama konzervacije (Rosenbom i sar., 2011). Mnoge studije su već potvrdile da su mikrosatelitske sekvence često očuvane i identične između različitih životinjskih vrsta pa čak i unutar familija, naročito kod kopitara (Beja-Pereira i sar., 2004). Pored zajedničkih mikrosatelita za konje i magarce, u studijama genotipizacije jaka (*Poephagus grunniens*) korišćeno je 136 mikrosatelita iz različitih panela za goveda koji su se u 95 procenata uspešno

amplifikovali (Minqiang i sar., 2003; Nguyen i sar., 2005; Xuebin i sar., 2005), što je i u saglasnosti sa drugim studijama na vodenim bivolima (*Bubalus bubalis*) gde su korišćeni genski lokusi za goveda (Kumar i sar., 2006; Zhang i sar., 2007; Vijh i sar., 2008). Ova činjenica je posebno važna jer omogućava prevazilaženje finansijskih i vremenskih ograničenja za generisanje novih markera kod ugroženih vrsta (Rosenbom i sar., 2011). Većina mikrosatelitnih ponovaka korišćenih za genotipizacije konja, koristila se i u prvim istraživanjima vezanim za magarce (Jordana i sar., 1999; Aranguren-Mendez i sar., 2001, 2004; Ivankovic i sar., 2002; Blasi i sar., 2005; Ciampolini i sar., 2010; Bordonaro i sar., 2012; Zhu i sar., 2013; Matassino i sar., 2014). Mikrosatelitni lokusi su uglavnom bili locirani na sledećim hromozomima: 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 15, 21, 28, X. U genomu domaćeg magarca opisani su mikrosateliti koji sadrže dinukleotidne ponovke koji su preuzeti iz panela mikrosatelita za konje (Rosenbom i sar., 2011). Mikrosateliti u genomu magarca su kao markeri korišćeni uglavnom u populaciono-genetičkim istraživanjima, ispitivanjima genetičke osnove različitih fenotipskih karakteristika, analizama genetičke heterogenosti pojedinačnih rasa i dr. Najvažnije studije zasnovane na ispitivanju polimorfizma mikrosatelita biće navedene i citirane u odeljku 2.8.1 (Genetička karakterizacija vrste magarac primenom mikrosatelita).

Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNPs). Unapređenje tehnike sekvenciranja novije generacije u pogledu brzine, troškova i tačnosti, kao i usavršavanje pratećih bioinformatičkih operacija, rezultiralo je mogućnošću očuvanja genetičkih resursa kod većeg broja životinjskih vrsta. Napravljen je pomak od "anonimnih" markera kao što su mikrosateliti do direktnih analiza varijabilnosti sekvence, gde spadaju i polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNPs). Dalja evolucija ove metodologije je omogućila da se nakon analize SNP markera kod ljudi i drugih komercijalno značajnih vrsta životinja, primeni i na široki spektar drugih životinjskih specijesa (Vignal i sar., 2002; Helyar i sar., 2011).

SNPs su varijacije u sekvenci DNK koje nastaju zamenom jednog od nukleotida (A, T, C ili G) u genomske sekvenci (Slika 10).



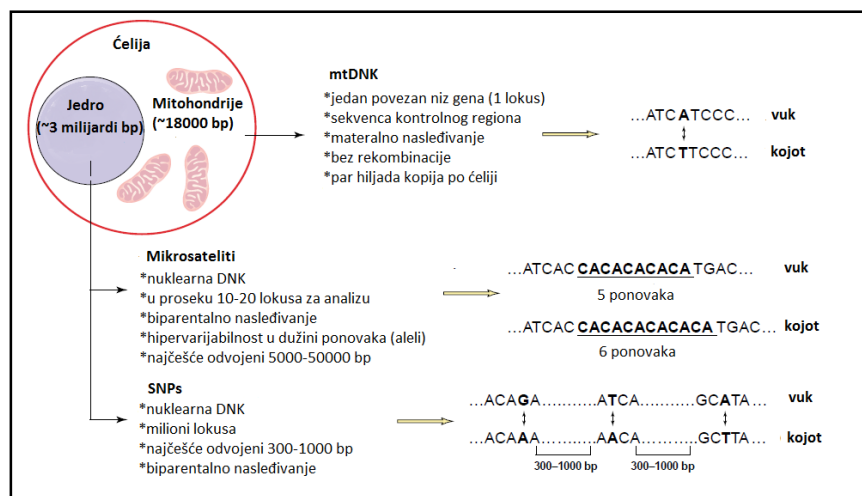
Slika 10. Primer polimorfizma pojedinačnih nukleotida.

Sva tri DNK lanca se razlikuju u jednom nukleotidu.

Oni su visoko zastupljeni u genomu većine vrsta (u kodirajućim i nekodirajućim regionima DNK), nastaju modelima proste mutacije (Morin i sar., 2004) a da bi varijacija mogla da se smatra polimorfizmom po tipu SNP, mora biti prisutna u najmanje jednom procentu populacije.

Prednosti korišćenja SNP kao markera (Slika 11) su dostupnost velikog broja markera, mala stopa grešaka, relativno laka mogućnost upoređivanja rezultata između laboratorija, kao i sposobnost povezivanja vremenski i prostorno različitih grupa podataka iz više laboratorija (Helyar i sar., 2011). Dodatno, mogućnost visoko osetljive genotipizacije unapredila je rezultate genotipizacije uzoraka lošeg kvaliteta kao što su arheološki i degradirani uzorci (Smith i sar., 2011), dok mogućnost analize i neutralnih regiona i onih koji su pod selekcijskim uticajem nudi neuporediv prostor za opširan skrining genoma i velikog broja uzoraka iz prirodnih populacija (Helyar i sar., 2011). Trenutno, paneli sa približno 50 000 SNP markera su dostupni za goveda (Bovine HapMap Consortium i sar.,

2009; Matukumalli i sar., 2009), svinje (Ramos i sar., 2009), ovce (<http://www.sheepmap.org>), koze (<http://www.goatgenome.org>) i živinu (Qanbari i sar. 2010; Groenen i sar., 2011). Procenjuje se da je tri do osam bialelnih SNP markera informativno kao jedan mikrosatelitni marker (Schopen i sar., 2008). Prednosti SNP kao genetičkih markera su dostupnost, brzina, pouzdanost i ponovljivi protokoli za genotipizaciju (Lenstra i sar., 2012). Ipak, postoje i izvesni nedostaci SNP kao genetičkih markera. U poređenju sa mikrosatelitima, potrebno je testirati daleko veći broj markera, pri čemu su metodologije genotipizacije SNPs još uvek veoma skupe i zahtevaju posebnu tehničku opremu (Morin i sar., 2004). Nedostatak SNP markera je da su osetljiviji nego mikrosateliti u slučajevima ako su sistematski izabrani na osnovu alela sa manjom frekvencijom u ograničenom broju rasa (Schlotterer, 2004; Albrechtsen i sar., 2010). Upravo zbog navedenog dolazi do nerealne procene diverziteta kod jedinki izabranih iz komercijalnih ("proizvodnih") populacija u odnosu na druge rase (Perez-Enciso i Ferretti, 2010).



Slika 11. Poređenje karakteristika mtDNK, mikrosatelita i SNPs kao genetičkih markera (na primeru moguće razlike DNK sekvence između vuka i kojota; ovakve razlike se mogu naći unutar ili između taksona) (Morin i sar., 2004)

Polimorfizam tipa kratkih insercija i delecija (Indels). Tokom poslednjih nekoliko godina je, pre svega kao posledica poboljšanja i unapređenja

metodologija sekvenciranja, došlo do uvođenja novih genetičkih markera kao što je polimorfizam tipa kratkih insercija i delecija koji se označava kao "indels" (Schlotterer, 2004). Insercija i delecija su tipovi mutacija kod kojih dolazi do dodavanja odnosno gubitka nizova nukleotida različite dužine. Uobičajeno se razmatraju zajedno i nazivaju imenom indeli zbog toga što je veoma često teško utvrditi koje je izvorno stanje, odnosno, postojanje niza nukleotida određene dužine ili njegovo odsustvo. Ako dođe do promene po tipu insercija/delecija u kodirajućem regionu genoma i ako broj dodatih/izgubljenih nukleotida nije deljiv sa tri, rezultat je pomeranje okvira čitanja odnosno "frameshift" mutacija. Promene po tipu insercija/delecija češće se dešavaju u nekodirajućim regionima genoma. Indels su prepoznati kao potencijalno veoma korisni genetički markeri koji su u velikom broju prisutni u različitim genomima. Tako je, na primer, ustanovljeno da od preko 10 miliona različitih polimorfizama u humanom genomu, oko 1,5 milion jesu upravo varijacije po tipu indels (Mills i sar., 2006). Imajući u vidu da je genetički diverzitet u mnogim prirodnim populacijama viši nego kod ljudi (Morin i sar., 2004; Ellegren, 2007), jasno je da se može očekivati da indels postanu veoma mnogo i široko korišćeni markeri za različite studije genetičke karakterizacije. Takođe je veoma važno da je metod genotipizacije korišćenjem varijabilnosti genoma u pogledu insercija / delecija relativno jednostavan, jer je bazični princip odvajanje fragmenata na osnovu dužine (Salathia i sar., 2007). Indels su kao genetički markeri korišćeni za ispitivanje humanog (Mills i sar., 2006) i drugih genoma kao što su genom kokoške (*Gallus gallus*) (Brandström i Ellegren, 2008) i genom *Drosophila melanogaster* (Ometto i sar., 2005). Za većinu ispitivanih indel lokusa ustanovili su da su polimorfni i da su potencijalno korisni kao genetički markeri, čak i u populacijama sa malim genetičkim diverzitetom. Takođe su pokazali da je individualna heterozigotnost određena na osnovu indels lokusa u potpunosti uporediva sa onom određenom na osnovu lokusa mikrosatelita.

Mitohondrijska DNK (mtDNK). MtDNK predstavlja malu frakciju totalne genomske DNK jednog organizma, ipak je jedan od najpopularnijih genetičkih markera u protekle tri decenije (Galtier i sar., 2009). Uprkos činjenici da se mtDNK nasleđuje materalno i da daje informaciju samo o ženskoj liniji, kao marker je neophodna u studijama praćenja evolucije jedne vrste kroz vreme. Informativnost mtDNK u praćenju veličine populacija kroz vreme, pojave genetičkog drifta (efekta osnivača) ili uskog grla, ogleda se u činjenici da je kod analize mtDNK potrebna četiri puta manja efektivna veličina populacije (par roditelja nosi 4 kopije jedarnih i 1 kopiju mitohondrijskih gena) što je čini podložnijom na promene brojnosti populacije tokom vremena (Destro-Bisol i sar., 2010). Dodatno, usled izostanka rekombinacija, mutacije u užem smislu (tačkaste mutacije ili substitucije baza) su jedine promene na mtDNK čija je stopa od 10 do 100 puta veća nego u jedarnom genomu, pri čemu kontrolni region ima višu stopu mutacija u odnosu na kodirajući region (Stoneking i sar., 1992). Smatra se da najveći procenat mutacija na mtDNK (>80%) čine tačkaste tranzicione mutacije (A-G, C-T) i na tRNK i na protein kodirajućim genima, dok je procenat transverzija (A-C, A-T, G-C, G-T) zantno manji (Crespillo i sar., 2006). Tranzicione mutacije nastaju najverovatnije usled delovanja selektivnog pritiska (Brown i sar., 1982), a navedene promene u kodirajućem regionu se klasifikuju kao patogene mutacije. Međutim, mutacije na kontrolnom regionu su selektivno neutralne što ovaj region izdvaja kao idealan marker u populaciono genetičkim studijama. Mesta na kontrolnom regionu sa visokom stopom mutacija se nazivaju hipervarijabilni segmenti kontrolnog regiona (eng. *hypervariable control region* - HVR) ili mutaciona „vruća“ mesta (eng. *mutational hotspots*) (Soares i sar., 2009).

Mitohondrijska DNK se veoma često koristi u filogenetskim studijama, odnosno, za utvrđivanje evolutivnih odnosa taksona. Pored toga, na osnovu poznavanja stope mutacija na mtDNK i primenom metode molekulaskog sata,

moguće je utvrditi i vremenski okvir u kojem je došlo do razdvajanja različitih linija. Hipotezu molekuskog sata su postavili Zuckerkandl i Pauling 1962. godine. Oni su pretpostavili da se mutacije u genima i njihovim proteinskim proizvodima dešavaju konstantnom stopom. Broj razlika između dve evolucione linije može poslužiti za procenu vremena odvajanja od poslednjeg zajedničkog pretka. Za rekonstrukciju filogenetskih odnosa i procenu vremena odvajanja od poslednjeg zajedničkog pretka koriste se stope mutacija genetičkog markera među ispitivanim blisko srodnim vrstama, a koje se pretvaraju u vreme koje je potrebno za jednu nukleotidnu zamenu. Tako jedna stopa sinonimnih zamena u humanom genomu odgovara periodu od 7884 godine (Soares i sar., 2009); jedna stopa zamena u kodirajućem regionu odgovara periodu od 4610 godina (Perego i sar., 2009) i jedna stopa zamena u kompletnom molekulu mtDNK odgovara periodu od 3624 godine (Soares i sar., 2009).

Osobina mtDNK da ne podleže rekombinacijama je omogućila njenu primenu i u filogeografskim studijama koje se bave evolutivnom istorijom gena i predstallaju vezu između populaciono genetičkih i filogenetskih studija (Avisé, 2000). U ovim studijama se utvrđuje geografska distribucija geneološki vezanih linijana na osnovu koje se izvode zaključci o genetičkim, evolucionim i drugim procesima koji su delovali na populacije tokom vremena. Dosadašnja istraživanja su pokazala da različite linije mtDNK pokazuju jaku tendenciju geografske struktuiranosti (Destro-Bisol sar., 2010).

Razlozi za odabir mtDNK kao markera su lako dostupna i dovoljna količina mtDNK u ćeliji; mitohondrijski geni su visoko konzervirani kod životinja sa vrlo malo duplikacija, bez introna i vrlo kratkim intergenskim regionima (Gissi i sar., 2008). MtDNK je visoko varijabilna u prirodnim populacijama zbog povišene stope mutacija kontrolnog regiona koja može obezbediti dovoljnu rezolucija čak i za istraživanja na nivou populacija i skorijih evolutivnih promena. Varijabilni

regioni (npr. kontrolni region) su obično okruženi konzerviranim sekvencama za koje se dizajniraju PCR prajmeri. Na osnovu navedenog, mtDNK je najpogodniji i najjeftiniji marker izbora za filogenetske i filogeografske analize, posebno u slučajevima divljih životinja kada su izbor i količina uzoraka ograničeni (Galtier i sar., 2009). U arheološkim uzorcima lakše je izdvojiti mtDNK od nuklearne DNK, a nekada je moguće dobiti samo mtDNK jer često jedna kopija nuklearne DNK brže degradira nego više kopija mtDNK. Osim toga, mtDNK akumulira mutacije brže nego nuklearna DNK, samim tim poseduje veću genetičku varijaciju i idealna je za proučavanje skorijih evolucionih procesa (Kimura i sar., 2013). Upravo iz navedenih razloga, mtDNK je veoma popularna za istraživanja vezana za pripitomljavanje životinja (Vilà i sar., 2001; Giuffra i sar., 2000; Luikart i sar., 2001). MtDNK i mikrosatelitski markeri predstavljaju najčešće upotrebljene genetičke markere za potrebe genetičke karakterizacije rasa.

2.8 Genetička karakterizacija farmskih životinja primenom mtDNK i mikrosatelita

Genetičkom karakterizacijom se detektuju slučajne i usmerene promene na DNK u cilju determinacije i rekonstrukcije evolucionih, ekoloških, istorijskih ili demografskih procesa (diverzitet, ekspanziju, uska grla, genetičku izolovanost, adaptacija i selekciju; Hey i Machado, 2003). Kod domaćih životinja je pripitomljavanjem ostala sužena genetička varijabilnost divljih predaka (Bradley i Magee, 2006; Naderi i sar., 2008), a formiranjem rasa su stvoreni različiti genetički šabloni na različitim nivoima, sa promenljivim intenzitetom protoka gena (Lenstra i sar., 2012). Istovremeno, usmerena selekcija dovodi do promene frekvence alela, što je takođe doprinelo smanjenoj efektivnoj veličini populacija rasa. Navedeni procesi su doveli do velikog broja rasa domaćih životinja sa smanjenim stepenom diverziteta, koji su, generalno, nastajali naglo i dinamično u odnosu na populacije

divljih životinja ili ljudi (Lenstra i sar., 2012). Poslednjih decenija, menjan je genetički profil domaćih životinja u cilju boljeg zadovoljavanja čovekovih potreba (Barker, 1999). Unapređenja u odgoju domaćih životinja, kvalitetu proizvoda životinjskog porekla ili efikasnosti u uzgoju istih, išla su dva pravca koja su se često dopunjavala u praksi. Jedan se bazirao na selekciji i odabiru jedinki unutar jedne rase, dok je drugi pravac kombinovao karakteristike različitih rasa međusobnim ukrštanjem, formiranjem novih rasa ukrštanjem između srodnih jedinki ili formiranjem sintetičke populacije (Barker, 1999). Povećana stočarska proizvodnja sa ekonomskim pritiscima (pre svega u razvijenim zemljama), političkim i socijalnim pritiscima (u zemljama u razvoju) usloveli su gubitak rasa ili naglo smanjenje brojnosti i ugroženosti velikog broja rasa koje su ekonomski neinteresantne. Veštačka osemenjavanja i embrio transfer su olakšali širenje favorizovanog genetičkog materijala. Pored toga, napredak u tehnologiji hrane omogućio je optimalnu ishranu proizvodnih rasa, dok su savremeni transport i komunikacioni sistemi doveli do uniformnih i strogo kontrolisanih proizvodnih okruženja. Kao rezultat, širom sveta su lokalne rase zamenjene visoko produktivnim rasama (Groeneveld i sar., 2010). Ipak, neke od tih autohtonih rasa, a posebno one koje su tokom evolucije adaptirane na lokalne uslove sredine (i stresogene faktore), nose vredne gene i genske kombinacije koje kontrolišu specifična ponašanja i normalne fiziološke funkcije, ali i osobine koje utiču na otpornosti na bolesti i parazite. Očuvanje i genotipizacija takvih rasa može biti od ključne važnosti za razvoj održivog proizvodnog sistema životinja u budućnosti (Lenstra i sar., 2012).

Goveda. Među prvim DNK istraživanjima na govedima spada analiza mtDNK regiona taurin i zebu goveda u cilju rekonstrukcije procesa domestikacije (Bradley i sar., 1996). Ova istraživanja su pokazala da su procesi domestikacije ovih goveda bili nezavisni zajednički, i da su se odvijali pre oko 8000 godina pre

nove ere u jugozapadnoj Aziji (taurin goveda) i Indus dolini (zebu goveda) (Zeder i sar., 2006; Zhang i sar., 2013; Larson i sar., 2014).

Goveda su jedna od prvih vrsta domaćih životinja za koju su izvršene studije genotipizacije korišćenjem mikrosatelita. Dobijeni rezultati su omogućili uvid u genetički diverzitet, strukturu i migraciju različitih rasa goveda. Hanotte i sar. (2002) su na osnovu rezultata analize mikrosatelita rekonstruisali migracione puteve zebu goveda, dok su meta analizom različitih setova lokusa objasnili divergenciju i ukrštanju zebu i taurinih goveda za područje Evrope, jugozapadne Azije i Afrike (Freeman i sar., 2006). Korišćenjem panela sa većim brojem mikrosatelita Lenstra i sar. (2006) su identifikovali različite subpopulacije goveda u području Mediterana i podelili alpske rase goveda na dve grupe rasa: centralno evropske (alpske rase, južna Francuska) i severno evropske rase. Upotrebom mikrosatelitskih markera dobijene su informacije o istoriji pojedinih rasa kao i stepenu njihove izolovanosti i inbridingu. Istraživanja su obuhvatala rase džerzej goveda (Chikhi i sar., 2004), Betizu subpopulaciju (Martin-Burriel i sar., 2007) i španska Lidia goveda (Canon i sar., 2008) sa Balearskih ostrva. Najviši stepen inbridinga je primećen kod engleskih Chillingham goveda, koja su postala genetički skoro potpuno homogena zbog striktno izolacije jednog postojećeg stada u trajanju od nekoliko stotina godina (Visscher i sar., 2001). Genetičkom karakterizacijom rasa kao što su severno-ruska goveda (Kantanen i sar., 2009), skandinavske rase goveda (Tapio i sar., 2006) i španske rase "Serrana di Teruel" (Martin-Burriel i sar., 2007) detektovan je protok gena iz drugih modernih i komercijalnih rasa goveda. Mikrosatelitski lokusi su korišćeni od strane Xuebin i sar. (2005) u svrhu određivanja genetičkog diverziteta mongolskih i ruskih populacija jaka (*Poephagus grunniens*). Osim kod jaka, isti lokusi su poslužili za definisanje različitih rasa vodenog bivola (*Bubalus bubalis*) u Indiji (Kumar i sar.,

2006; Vijn i sar., 2008), Kini (Zhang i sar., 2007), Italiji, Grčkoj i Egiptu (Moioli i sar., 2001).

Ovce. Ovca (*Ovis aries*) je pripitomljena u jugozapadnoj Aziji pre oko 12 000 godina i predstavlja jednu od najranije domestikovanih vrsta domaćih životinja (Zeder i sar., 2006). Kao i u studijama koje su se bavile poreklom drugih životinja (Bruford i sar., 2003), odnosi današnjih rasa ovaca sa predačkim vrstama i rasama su utvrđivani poređenjem različitih linija dobijenih analizom varijabilnosti mtDNK. Uporednom analizom mtDNK izumrlih jedinki vrsta roda *Ovis* nađenih u arheološkim istraživanjima, Hiendleder i sar. (2002) su pronašli dve haplogrupe A i B, i obe se neznatno razlikuju u odnosu na sekvence današnjih rasa ovaca. Evropski muflon (*Ovis musimon*) pripada haplogrupi B i predstavlja divlju formu ranih evropskih domaćih rasa. Smatra se da ovce vode poreklo od jednog ili više varijeteta azijskog muflona *Ovis orientalis* (Hiendleder i sar., 2002). Nekoliko studija je dodatno analiziralo geografsku distribuciju haplotipova, i ustanovljena je podjednaka zastupljenost glavnih haplotipova A i B u Aziji (Meadows i sar., 2007), dok haplotip B dominira u Evropi (Bruford i sar., 2003; Meadows i sar., 2005). Visoka učestalost haplotipa A na Novom Zelandu je rezultat ranog uvoza životinja iz Indije u Australiju (Hiendleder i sar., 2002).

Na osnovu opsežnih analiza genetičkog diverziteta evropskih ovaca, koristeći 57 rasa i 31 mikrosatelitski lokus, Peter i sar. (2007) su primetili tri genetičke grupe rasa ovaca: jugozapadno-azijske, jugoistočno-evropske i centralno i zapadno evropske. U drugoj studiji, odvojena je još jedna velika populacija ovaca nazvana severno-evropska kratkorepa ovca, koja se dalje može podeliti na severozapadnu, severoistočnu i heterogenu švedsko-norvešku liniju (Tapio i sar., 2005). Za populaciju ovaca u Etiopiji sprovedena je klasifikacija rasa na osnovu fenotipskih i mikrosatelitskih podataka u tri grupe: tankorepe, masnorepe i tovne rase (Gizaw i sar., 2007). Santos-Silva i sar. (2008) su proučavali strukturu i

diverzitet portugalskih rasa ovaca i utvrdili jasnu razliku od uvozne asaf rase; iste godine na Balkanu, Ćinkulov i sar. (2008) vrše genetičku karakterizaciju domaće planinske rase ovaca – pramenke koja je podržala diferencijaciju ove rase na vise sojeva.

Koze. Koze (*Capra hircus*) su pripitomljene oko 10 000 godina pre nove ere u jugozapadnoj Aziji, u sličnom periodu i regionu kao i ovce. Iako su vrste približno slične veličine, koze su zbog dobrog prilagođavanja na loše uslove životne sredine našle svoju primenu tokom razvoja ljudskog društva (Groeneveld i sar., 2010). Koze najverovatnije potiču od divlje bezoar koze - *Capra aegagrus* (Naderi i sar., 2008). Na osnovu analiza varijabilnosti mtDNK utvrđeno je postojanje više haplogrupa ove vrste. Preko 90% koza širom sveta pripada haplogrupi A (Naderi i sar., 2008). Haplogrupa B je danas uglavnom zastupljena u Aziji i Južnoj Africi, haplogrupa C u južnoj Evropi, haplogrupa D u Aziji, haplogrupa P samo u sicilijanskoj Girgentata rasi i haplogrupa G u jugozapadnoj Aziji i severnoj Africi. Podgrupa B1 je ograničena na Kinu i Mongoliju, dok je druga podgrupa, B2, specifična za Kanarska ostrva na kojima je verovatno opstala usled izolacije tamošnje populacije koza. Haplogrupe A-G su prisutne u populacijama bezoar koza. Raspodela haplogrupa ukazuje da su istočna Anadolija i region palmnskog masiva Zagros bili najvažniji centri pripitomljavanja koza (Naderi i sar., 2008).

Genotipizacijom različitih rasa koza primenom nuklearnih mikrosatelita je otkriven visok stepen geografskog strukturiranja. U do sad najopsežnijem istraživanju (Canon i sar., 2006), opisano je 45 rasa iz Evrope i Bliskog istoka i ispitivane populacije koza su na osnovu mikrosatelitskih podataka podeljene u četiri grupe: srednjeistočne, centralno-mediteranske, zapadno-mediteranske i centralno/severno-evropske. Geografsko strukturiranje korišćenjem rezultata mikrosatelitske genotipizacije takođe je prijavljeno za populacije koza iz Burkina Faso (Traore i sar., 2009), Indije (Rout i sar., 2008) i severnog Vijetnama (Berthouly

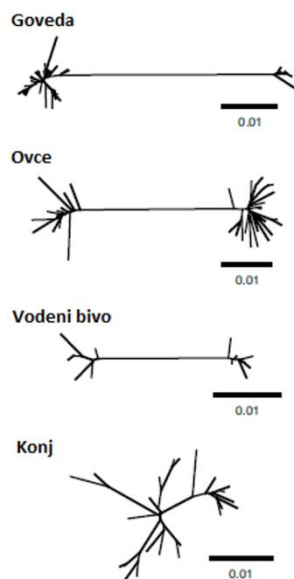
i sar., 2009). Konzervacionu vrednost kod švajcarskih rasa koza na osnovu mikrosatelitskih podataka istražili su Glowatzki-Mullis i sar. (2008). Jasno filogeografsko struktuiranje evropskih rasa koza je verovatno odraz njihovog načina gajenja. Za razliku od ovaca i goveda, za koze je postoji ograničen ekonomski značaj pa je i uzgoj ostao uglavnom na lokalnom nivou (Groeneveld i sar., 2010).

Svinje. Molekularno-genetičke analize na nivou mtDNK su rasvetlile procese domestikacije današnjih rasa svinja (*Sus scrofa domesticus*). Prve studije koje su koristile mtDNA kao marker su pokazale da su evropske i kineske rase domaćih svinja pripitomljene u odvojenim procesima, i da su one poreklom od evropskih i azijskih vrsta divljih svinja (Giuffra i sar., 2000; Vigne, 2011; Groenen i sar., 2012). Kasnije studije su otkrile najmanje sedam mogućih događaja pripitomljavanja širom Evroazije (Larson i sar., 2005) i istočne Azije (Wu i sar., 2007). Ove studije takođe navode dokaze ukrštanja azijskih domaćih svinja sa pojedinim evropskim rasama tokom 18. i 19. veka. Larson i sar. (2007) su pokazali da su domaće rase svinja poreklom sa Bliskog istoka uvedene u Evropu tokom neolita, u isto vreme kada je došlo do pripitomljavanja evropske divlje svinje. Kada je proces pripitomljavanja evropske divlje svinje završen, nastale rase prvih domaćih evropskih svinja brzo su zamenile populacije uvedenih domaćih svinja Blisko-istočnog porekla.

Širom sveta se skoro 400 rasa svinja ekonomski eksploatiše, a najveći broj se nalazi u Aziji i Evropi (Groeneveld i sar., 2010). U zajedničkom projektu Evropske unije (PigBioDiv 1), korišćenjem 50 mikrosatelitih lokusa izvršena je genotipizacija 58 populacija evropskih svinja, uključujući međunarodne, nacionalne i lokalne rase, komercijalne populacije u privatnom vlasništvu i kinesku meštan rasu kao udaljene srodničke grupe (outgroup). Mikrosatelitski podaci pokazali su da se diverzitet između rasa kretao od 0,04% do 3,94% (Ollivier i sar., 2005). San

Cristobal i sar. (2006) analiziranjem istih podataka, pokazuju jasnu strukturu evropskih rasa svinja sa genetičkom diferencijacijom od 21%. Sa izuzetkom pet lokalnih rasa, nije bilo moguće utvriti genetičku strukturu analiziranih rasa i niti vidljive filogenetske odnose između lokalnih i važnijih međunarodnih rasa. Čak ni uključivanje kineske meštan rase kao udaljene srodničke grupe nije omogućilo da se utvrdi filogenetska distancu između evropskih rasa.

Konji. Mnogobrojne studije fokusirane na domestikaciju konja u širem smislu, ili na poreklo određenih rasa konja (Vila i sar., 2001; Jansen i sar., 2002; Kavar i sar., 2002; Kavar i Dovc, 2008), opisale su preko 100 različitih linija na osnovu analize mtDNK. Zajedničke analize su pokazale da, za razliku od topologije mtDNK filogenetskih stabala sa dvostrukim centralnim izvornim haplotipovima kod većine domaćih životinja (Troy i sar., 2001; Bruford i sar., 2003; Slika 12), mtDNK filogenetsko stablo konja pokazuje zvezdstu strukturu grananja (Jansen i sar., 2002;. Kavar i Dovc, 2008).



Slika 12. Neighbor-joining filogenetsko stablo četiri domaće životinje na osnovu njihovih mtDNK sekvenci (preuređeno iz Zander i sar., 2006)

Analizirajući mtDNK postojećih rasa konja kao i divljih konja koji su živeli od 12 000 do 28 000 godina pre nove ere, nađena je neočekivano visoka genetička razlika između dobijenih klada (Vila et al., 2001). Dodatno, obradom drevnih DNK uzoraka konja nađenih u kineskim grobnicama iz 3. veka pre nove ere (Keyser-Tracqui i sar., 2005) i iz bronzanog doba (Lei i sar., 2009) nađen je visok mtDNK diverzitet. Rezultati navedenih studija i arheoloških istraživanja ukazuju na to da je visok nivo genetičkog diverziteta postojao pre procesa pripitomljavanja, oko 6000 pre nove ere na širokom području evroazijske stepe (Groeneveld i sar., 2010). Međutim, prvobitni scenario domestikacije konja se od nedavno dovodi u pitanje, usled dobijenih rezultata analize majčinskih linija Lusitano i Soraia populacija konja, koji ukazuju na značajnu ulogu Iberijskog poluostrva kao drugog mogućeg centra pripitomljavanja za vreme glacijala (Lopes i sar., 2005).

Podaci o genetičkom diverzitetu različitih rasa konja na osnovu mikrosatelitskih lokusa su korišćeni radi utvrđivanja stepena genetičke sličnosti između rasa, a samim tim i rekonstrukcije evolutivne istorije konja (Mittmann i sar., 2010). Podaci dobijeni analizom mikrosatelita su korišćeni za procenu odnosa između sedam španskih keltskih rasa konja sa 60 drugih čistokrvnih populacija konja (Canon i sar., 2000). Istom metodologijom utvrđeno je da Japanski konji vode poreklo od mongolskih konja koji su migrirali preko Korejskog poluostrva (Tozaki i sar., 2003; Kakoi i sar., 2007), ali je i podržana hipoteza da su konji iz centralne Azije imali genetičkog upliva u populacije konja severne Evrope (Bjørnstad i sar., 2003). Genetičkom karakterizacijom korišćenjem mikrosatelitskih panela u studiji Aberle i sar. (2004), podržane su tri genetičke grupe analiziranih rasa i to: (1) dve rase jahaćih konja (arapski i hanoverski), (2) dve primitivne rase (Exmoor i Sorraia) i (3) šest nemačkih teških rasa. Slično tome, Bigi i sar. (2007) su koristeći 12 markera grupisali zajedno punokrvne i anglo-arapske rase i odvojili u drugi klaster italijasku rasu teških konja (Haflinger) sa bodaglino rasom.

2.8.1 Genetička karakterizacija vrste magarac primenom jedarnih mikrosatelita

Za većinu domaćih životinjskih vrsta FAO (FAO, 2011) preporučuje standardizovane panele od oko 30 mikrosatelita za potrebe analize parametara genetičke varijabilnosti, individualnu identifikaciju, određivanje roditeljstva i filogenetsku rekonstrukciju. Standardni paneli od 12 odabranih mikrosatelita za konje i goveda su uvedeni od strane Međunarodnog društva za genetiku životinja (ISAG - *International Society for Animal Genetics*) i rutinski se koriste za individualnu identifikaciju i testiranje porekla (Dimsoski, 2003; Van de Goor i sar., 2010; 2011; Lenstra i sar., 2012). Pored dvanaest standardnih mikrosatelitnih lokusa za konje (AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG10, HTG4, VHL20, ASB17 i ASB23) u upotrebi je još pet dodatnih lokusa (HTG6, HTG7, CA425, HMS1 i LEX3) usvojenih 2012. godine (Georgescu i Costache, 2012; Fornal i sar., 2013). Pored konja, za druge ekvide ne postoje komercijalno dostupni paneli. FAO je 2011. godine objavio preporuke o metodologiji molekularne karakterizacije životinjskih genetičkih resursa u kojima su determinisani paneli mikrosatelita za konja i magarca. Panel za genetičku karakterizaciju rasa magaraca je skoro u potpunosti preuzet od konja, pa se u populaciono genetičkim i forenzičkim ispitivanjima koja uključuju magarca koristi većina mikrosatelitskih lokusa iz preporučenog panela konja.

Zbog zapostavljanja magarca kao vrste sredinom 20. veka, došlo je do opadanja broja magaraca kod pojedinih rasa koje su registrovane kao kritično ugrožene. U nastaloj situaciji, krajem 90-ih godina prošlog veka, naučna javnost je preuzela inicijalne korake u cilju zaštite ugroženih rasa, koje su podrazumevale sakupljanje demografskih podataka, fenotipsku i genetičku karakterizaciju. Bellone i sar. (1998) je među prvima koji je analizirao genetički diverzitet jedne

ugrožene francuske rase magaraca, Baudet de Poitou. Naime, Baudet de Poitou rasa potiče iz severozapadne Afrike i naseljen je na područje Francuske u 10. veku. Poitou magarac spada u veće magarce i korišćen je za uzgoj mula koje su se izvozile u mnoge zemlje. U drugoj polovini 20. veka naglo opada brojnost ovih magaraca, i 1972. godine rasa je skoro izumrla (Kugler i sar., 2008). Genotipizacijom rase Baudet de Poitou 1998. godine dobijeni su podaci značajni za uvid u stvarno stanje genetičke varijabilnosti, dalje odgajivačke planove i reintrodukciju.

Među ugroženim evropskim rasama krajem 80-ih i početkom 90-ih spada i katalonski magarac, rasa koja je na osnovu podataka Jordana i Folch (1996) brojala 100 jedinki od kojih je trećina bila muškog pola. Španci su formirali Konzervacioni program za katalonskog magaraca, koji je trebalo da između ostalog genetički opiše rasu. U studiji Jordana i sar. (1999), koja je obuhvatala 98 jedinki što je u tom trenutku činilo 95% od ukupnog broja, testirano je 12 mikrosatelitskih lokusa preuzetih iz panela konja. Nakon dve godine, Aranguran-Mendez i sar. (2001) nastavljaju rad na genetičkom diverzitetu španskih rasa magaraca: Andaluza, Catalana, Mallorquina, Encartaciones i Zamorano-Leonesa analizirajući 13 lokusa iz FAO preporučenog panela mikrosatelita za konja. Većina korišćenih mikrosatelita se uspešno amplifikovala i pokazala polimorfnost u ispitivanim populacijama španskih rasa magaraca. Dobijene su visoke vrednosti genetičkog diverziteta među ispitivanim španskim rasama magaraca. U studiji Aranguren-Mendez i saradnika, grupa autora je 2001. godine izvršila genetičku karakterizaciju španskih rasa magaraca ali je u studiji bilo uključeno i devet magaraca marokanskog porekla. Na osnovu dobijenih podataka utvrđeno je substrukuiranje španskih magaraca na nivou rasa i unutar rasa (između subpopulacija). Takođe, pokazana je genetička sličnost andaluzijskih i marokanskih magaraca koji su formirali poseban klaster, dok su preostale severno

španske rase formirale drugi klaster (Catalana, Mallorquina, Encartaciones i Zamorano-Leonesa) što je u saglasnosti sa istorijskim i arheološkim podacima.

U cilju obezbeđivanja baze podataka za konzervacione programe, Ivanković i sar. (2002) su izvršili molekularno-genetičke analize na tri populacije magaraca u Hrvatskoj. Studija je obuhvatila ukupno 75 jedinki iz tri populacije magaraca: istarske, severno-jadranske i primorsko-dinarske, i korišćeno je osam mikrosatelita preuzetih iz studija genotipizacije konja: MPZ002, HMS1, HMS8, NVHEQ18, AHT21, LEX024, UCDEQ502 i UCDEQ505. Molekularno-genetički podaci su podržali fenotipsku diferencijaciju između tri ispitivane populacije magaraca. Značajan stepen genetičke varijacije prisutan u populacijama sa malim brojem jedinki (istarska i severno-jadranska) ukazao je da još uvek postoji mogućnost za uvođenje odgajivačkih programa u cilju očuvanja magaraca u Hrvatskoj.

Prva genetička istraživanja italijanskih magaraca obuhvatila su ugrožene rase magaraca sa Sicilije (Blasi i sar., 2005) i amiata rasu magaraca (Cecchi i sar., 2006; Ciampolini i sar., 2007). Nakon demografskih istraživanja (Cecchi i sar., 2006) i formiranja elektronske baze podataka za amiata magarce u Toskani, Ciampolini i sar. (2007) su analizirali genetičku varijabilnost istih na području Toskane i Lacija koristeći 18 mikrosatelitskih lokusa i 50 jedinki. Primećena je smanjena genetička varijabilnost unutar ispitivane populacije što je u saglasnosti sa prethodnim demografskim istraživanjem (Cecchi i sar., 2006), a kao razlog se navodi nagli pad brojnosti amiata magaraca tokom poslednjih godina što se odrazilo na njihov diverzitet (usko grlo). Rase magaraca sa Sicilije (ragusano, pantesko i sicilijanski sivi) kao ugrožene rase bile su predmet istraživanja u cilju utvrđivanja nivoa genetičkog diverziteta i genetičke strukture (Guastella i sar., 2007). Ukupno 116 jedinki poreklom iz 9 krda širom Sicilije je analizirano na osnovu polimorfizma 11 mikrosatelitnih lokusa (HTG10, VHL20, HTG7, HTG4,

AHT5, AHT4, HMS3, HMS6, HMS7, HMS2 i HTG6). Rezultati su pokazali visok diverzitet ispitanih populacija, dok je pantesko rasa pokazala veću genetičku distancu u odnosu na ragusana i sicilijanski sivu rasu magaraca, koje su međusobno genetički vrlo bliske. Objašnjenje se može naći u činjenici da ove dve rase dele isto poreklo; do 1953. godine postojala je samo jedna lokalna sicilijanska rasa koja fenotipski odgovara ragusana i sicilijanskoj sivoj rasi magaraca. Bordonaro i sar. (2012) su potvrdili nalaze Guastella i sar. (2007) analizirajući veći broj jedinki sa 14 mikrosatelitskih lokusa, ali su i ukazali na substruktuiranje ragusano rase na dve subpopulacije.

Colli i sar. (2012) su izvršili genotipizaciju osam rasa koje je FAO klasifikovao u tom trenutku kao kritično ugrožene ili ugrožene: asina, pantesko, sicilijanski sivi, romanjolo, amiata, sardinijski sivi, Martina Franca, i ragusano. Genetička varijabilnost italijanskih magaraca je procenjena na osnovu podataka za 16 mikrosatelitskih lokusa kod 258 jedinki. Rezultati su pokazali umeren nivo ukrštanja u srodstvu i visok stepen genetičke diferencijacije između rasa. To je potvrđeno dobijenim grupisanjem ispitivanih populacija gde je naglašena dalja podela na niže hijerarhijske nivoe što odgovara različitim farmama. Prema Colli i sar. (2012), delotvorna strategija za upravljanje i očuvanje italijanskih rasa magaraca trebalo bi da ima fokus na rasi, kao jedinstvenoj konzervacionoj jedinici. Značaj održanja pojedinačnih rasa i njihovo substruktuiranje, potvrđuje studija Matassino i sar. (2014) na amiata i viterbese magarcima. Ukupno 135 životinja je okarakterisano na osnovu 16 mikrosatelitskih markera. Utvrđena je visoka genetička diferencijacija između populacija dok je na osnovu *STRUCTURE* analize i analize molekularne varijanse ukazano na postojanje genetički različitih entiteta. Dodatno, rezultati dobijeni u ovoj studiji sugerišu da prividno nizak nivo genetičkog diverziteta kod viterbese magaraca proističe iz neprimetnog

struktuiranja subpopulacija (Wahlund efekat) pre nego neki drugi faktori kao što su inbriding, nulti aleli ili uticaj selekcije.

Od sedam vrsta roda *Equus* koje danas postoje, afričkom divljem magarcu (*Equus africanus*) pretil istrebljenje. Imajući navedene činjenice u vidu, Rosenbom i sar. (2011) su testirali 25 objavljenih konjskih mikrosatelitskih lokusa na 22 afrička divlja magarca iz populacija nastanjenih u divljim rezervatima i zoološkim vrtovima. Od 25 testiranih lokusa, 15 lokusa se uspešno amplifikovalo i pokazalo prosečan broj alela od 5.06 po lokusu sa prosečnim vrednostima genetičkog diverziteta ($H_E = 0.59$). Na osnovu dobijenih rezultata predloženi su polimorfni markeri koji se mogu koristiti kao standardni set u budućim studijama o očuvanju genetičkog diverziteta afričkog divljeg magarca (Rosenbom i sar., 2011).

Dostupnost uzoraka naslednog materijala poreklom od jedinki iz različitih vremenskih razdoblja omogućila je molekularno-genetičke analize drevnih jedinki, a sve u cilju determinacije porekla vrste magarac i mogućim lokacijama procesa pripitomljavanja. Uzorci koji potiču sa lokacija koje važe za centre pripitomljavanja određene vrste, trebalo bi da pokažu veći diverzitet genetičkog materijala (Troy i sar., 2001). Širenjem populacije dalje od centara porekla, genetički diverzitet opada kao posledica smanjenog i ograničenog broja jedinki uključenih u ove ekspanzije ("efekat osnivača"). Navedeni šablon smanjenja diverziteta sa povećanjem udaljenosti od predloženih centara porekla je pronađen u studijama koje su analizirale goveda korišćenjem autozomalnih markera (Loftus i sar., 1999; Cymbron i sar., 2005). Glavne lokacije na kojima su se nalazile populacije sa najvećim diverzitetom ("*hotspots of diversity*") nazvane su centrima porekla, koja često mogu da se, u pogledu nivoa genetičkog diverziteta, pogrešno poistovete sa oblastima koje se smatraju privremenim tj. distributivnim lokacijama (drevna trgovinska područja ili putevi) u kojima je dolazilo do mešanja i razmene genetičkog materijala između različitih subpopulacija (rasa). Rosenbom i sar.

(2014) su analizirali nivo genetičke varijacije prvih domaćih magaraca iz navodnih centara porekla i divljih magaraca koristeći nuklearne markere. Stepni i distribucija genetičkog diverziteta utvrđeni na osnovu polimorfizma 15 mikrosatelitskih lokusa za osam populacija ukazuje na tri lokacije geografskog porekla magaraca: severoistočna Afrika, Bliski Istok i Arapsko poluostrvo. Dobijeni rezultati su pokazali srednje vrednosti genetičkog diverziteta širom populacija u ispitivanim geografskim regionima. Rezultati Rosenbom i sar. (2014) su podržali ranije predloženi severoistok Afrike kao navodni centar porekla, ali uočeni visok nivo diverziteta u Jemenu otvara mogućnost razmatranja ovog regiona kao još jednog centra porekla domaćih magaraca.

Prvi uvid u nivo genetičkog diverziteta i strukturu južnoameričke populacije magaraca omogućili su Jordana i sar. (2015). Cilj njihovog istraživanja bio je opisivanje genetičke strukture južnoameričkih populacija magaraca, identifikacija granice između genetički diferenciranih populacija, i determinacija glavnih puteva kolonizacije od naseljavanja magaraca na Američki kontinent krajem 15. veka. Panel od 14 mikrosatelitskih markera je korišćen za genotipizaciju 350 američkih magaraca iz 13 zemalja, a dobijeni podaci su potom upoređeni sa bazom podataka koja sadrži informacije o 476 magaraca od 11 evropskih rasa da bi identifikovali najverovatnije pretke donorskih populacija. Rezultati su pokazali prisustvo dve genetički zasebne grupe, koje su podjednako zastupljene samo u Kolumbiji. Južna grupa je pokazala homogenu genetičku strukturu, dok je severna grupa magaraca zadržala predačke polimorfizme i/ili je doživela upliv današnjih gena poreklom od španskih rasa magaraca. Andaluzijske, i u manjoj meri katalonske rase, ostavile su jasne genetičke tragove koje su se odrazili na diverzitet u nekim od analiziranih američkih rasa magaraca.

2.8.2 Genetička karakterizacija vrste magarac primenom mtDNK

Prvo istraživanje vezano za mtDNK magaraca izvršili su Xu i sar. (1996) kada je utvrđen primarni redosled nukleotida celog mitohondrijskog genoma magaraca (16.670bp) i upoređen sa sekvencama konja, foke, kita i šimpanze u cilju utvrđivanja evolutivnih odnosa. Sekvenca mitohondrijskog genoma mararca itvrđena od strane Xu i sar. se najčešće koristi kao referentna sekvenca u istraživanjima diverziteta, filogenetskih i filogeografskih odnosa unutar vrste magarac. U većini studija se koristio hipervarijabilni nekodirajući kontrolni region (HVR1) koji je sastavni deo većeg regiona obeleženog kao D-loop (Ivankovic i sar., 2002; Aranguren-Mendez i sar., 2004; Beja- Pereira i sar., 2004; Lopez i sar., 2005; Lei i sar., 2007; Chen i sar., 2006). Pored HVR1 regiona, ređe je korišćena citohrom B (Cytb) komponenta mitohodrijskog sistema za oskidativnu fosforilaciju (Orlando i sar., 2009; Chen i sar., 2010).

Proučavanje domestikacije magaraca i njegovog evolutivnog procesa započeto je istraživanjima genetičkog diverziteta različitih vrsta u okviru roda *Equus*. U okviru familije ekvida, pokazano je da su konji najverovatnije divergirali od drugih vrsta pre oko 2-3 milion godina, dok je odvajanje magaraca i zebri usledilo kasnije (Oakenfull i sar., 2000). Filogenetske analize mitohondrijskih 12S RNK gena i kontrolnog regiona (Oakenfull i sar., 2000), samo mtDNK kontrolnog regiona (Vila i sar., 2006) i citohrom b gena (Orlando i sar., 2009) dale su praktično identične rezultate, pokazujući jasnu podelu između konja, zebri, azijskih divljih magaraca i domaćih magaraca.

Različita istraživanja mitohondrijskog genetičkog diverziteta dele magarce u dve linije, klada 1 i 2 (Beja-Pereira i sar., 2004; Chen i sar., 2006; Lei i sar., 2007; Zhang i sar., 2010; Kimura i sar., 2011). Analiza 440 bp mitohondrijskog kontrolnog regiona je pokazala da su klade 1 i 2 divergirale pre najmanje 100.000 godina, odnosno, mnogo pre procesa pripitomljavanja (Kimura i sar., 2011). Obe

klade su približno jednako zastupljene širom sveta, iako Beja-Pereira i sar. (2004) pokazuju veći procenat zastupljenosti haplotipova klade 1 u zapadnoj Africi u odnosu na druge regione Afrike, broj uzorkovanih životinja je bio suviše mali da bi se doneo ovakav zaključak (Kimura i sar., 2013). U studiji italijanskih rasa magaraca, jedna od pet analiziranih rasa imala je samo mtDNA haplotipove iz klade 2 (Pellecchia i sar., 2007). Međutim, filogenetska analiza domaćih rasa magaraca u Evropi je komplikovana zbog naglog pada brojnosti populacije magaraca u dvadesetom veku (Aranguren-Mendez i sar., 2001), što može biti uzrok gubitka životinja iz klade 1. Obimne studije kineskih magaraca su pokazale da podela rasa magaraca na klade nemaju veze sa veličinom populacija ili geografskim poreklom (Lei i sar., 2007; Chen i sar., 2010; Zhang i sar., 2010; Han i sar., 2014). Na osnovu iznetih činjenica, do danas, raspodela haplogrupa magaraca u kladama ne pokazuje jasan geografski obrazac (Kimura i sar., 2013).

Beja-Pereira i sar. (2004) su na osnovu mtDNK kontrolnog regiona uporedili sekvence magaraca poreklom iz 52 zemlje širom sveta i našli izražen genetički diverzitet u severoistočnoj Africi, sugerišući da je to centralni region domestikacije magaraca. Na osnovu dosadašnjih studija koje su analizirale mtDNK, još nije utvrđeno koja podvrsta afričkih divljih magaraca predstavlja pretka klade 1 i 2. U već pomenutoj studiji Beja-Pereira i sar. (2004) su analizirali sekvence kontrolnog regiona mtDNK današnjih rasa magaraca iz različitih delova sveta sa sekvencama izumrlih somalijskih i nubijskih divljih magaraca. Oni su zaključili da je klada 1 blisko povezana sa nubijskim divljim magarcima, a da je klada 2 verovatno izvedena iz somalijske populacije divljih magaraca. Prve studije orjentisane na domestikaciju se fokusiraju na divlje magarce pre nego na domaće rase magaraca. Kimura i sar. (2011) su analizirani uzorke više od 30 sačuvanih somalijski divljih magaraca i drevnih DNK uzoraka poreklom od 9 nubijskih divljih magaraca iz muzejskih zbirki. Rezultati Kimura i sar. (2011) potvrđuju

zaključak Beja-Pereira i sar. (2004) da je nubijski divlji magarac najverovatniji predak klade 1, ali su pokazali da somalijski divlji magarac nije mogao biti predak klade 2 jer ih veliki broj mutacija (čak 12) razdvaja somalijske divlje magarce i kladu 2. Shodno tome, nisu poznate afričke divlje podvrste magaraca koje bi mogle biti preci klade 2. Kao mogući preci za kladu 2 pominju se atlas divlji magarac, divlji magarci u Jemenu ili drugi sada izumrli afrički divlji magarci (Kimura i sar., 2013).

Kefena i sar. (2014) su istraživali polimorfizam mtDNK sekvenci kod šest morfološki različitih populacija domaćih magaraca u Etiopiji i to: *Abissinian*, *Afar*, *Hararghe*, *Ogaden*, *Omo* i *Sinnar*. Genetički odnosi i drugi parametri diverziteta su izvedeni na osnovu 39 mtDNK D-loop sekvenci, koje su posedovale 29 polimorfnihih mesta na osnovu kojih je definisano 19 različitih haplotipova. Filogeografske mreže dobijene analizom haplotipova ukazuju na davne demografske i prostorne ekspanzije. Dodatno, procene strukturne podele populacija uključenih u studiju, pokazale su da se magarci iz *Sinnar* populacije znatno razlikuju od ostalih etiopskih populacija magaraca. Poređenjem mtDNK haplotipova etiopskih magaraca sa 221 prethodno objavljenom sekvencom istog regiona mtDNK, etiopski magarci su zauzimali centralne pozicije u filogeografskim mrežama, što sugeriše da bi Etiopija mogla biti jedan od centara diverziteta domaćih rasa magaraca u Africi.

Populacija balkanskog magarca je danas široko rasprostranjena rasa sa najvećim brojem jedinki na Balkanskom poluostrvu. S obzirom na istorijske činjenice da su Grci naselili obale Mediterana magarcima koji su fenotipski odgovarali balkanskom magarcu, kao i da se u doba rimljana ova rasa raširila širom jugoistočne Evrope, Perez-Pardal i sar. (2014) su analizirani različite populacije balkanskog magarca da bi utvrdili njihovu regionalnu genetičku strukturu i došli do saznanja o širenju rase nakon pripitomljavanja. Ukupno 132

mtDNK sekvence poreklom od 10 populacija balkanskog magarca su analizirane i dobijeno je 55 haplotipova mtDNK koje su dodeljene ili kladi 1 ili kladi 2, iako su se relativne proporcije haplotipova u kladama 1 ili 2 razlikovale u zavisnosti od populacije. Na osnovu analiza geografske distribucije srodnih haplotipova i molekularne varijanse pokazano je da su populacije balkanskog magarca prostorno nestruktuirane. Divergencija između balkanskog magarca i afričkih magaraca je bila mala što sa nedostakom geografskog struktuiranja sugeriše na veoma brzo širenje vrste nakon pripitomljavanja.

2.9 Balkanski magarac

Balkanski magarac je kopitar koji se prvobitno gajio u brdsko-planinskom području balkanskog poluostrva. Tokom 20 veka broj magaraca ove rase stalno opada delimično zbog gubitka interesa za uzgoj ovog kopitara, a još više zbog veoma odmakle depopulacije i napuštanja ruralnog područja od strane ljudi. Danas, najveće populacije balkanskog magarca u Republici Srbiji se nalaze u Specijalnom rezervatu prirode „Zasavica”, na Krčedinskoj adi i obali Dunava blizu mesta Kovilj i na Staroj planini (Slika 13). Relativno mala populacija ovih jedinki ima široku geografsku distribuciju unutar teritorije R. Srbije (Stanišić i sar., 2015a).



Slika 13. Geografski prikaz lokacija tri najveće populacije magaraca u Srbiji.

Specijalni rezervat prirode „Zasavica“ (ZA) zauzima 1.825 hektara površine, od kojih 671 hektar predstavlja područje drugog stepena zaštite na kome se populacija magaraca slobodno kreće tokom cele godine (Stankovic, 2006). Populacija magaraca u ZA je formirana 1997. godine, kada su jedinke rase balkanski magarac poreklom iz južne Srbije (Stara planina, Pešter, okolina Dimitrovgrada) prebačene u rezervat. Istovremeno, jedinke za koje se smatra da pripadaju neokarakterisanoj rasi banatski magarac (Slika 14) poreklom iz istočne vojvođanske regije - Banat, su takođe prebačene u rezervat. Trenutno ne postoje detaljniji podaci o poreklu magaraca koji se nalaze u ZA, i ova populacija broji oko 180 jedinki.



Slika 14. a - balkanski magarac, b - jednike za koje se smatra da pripadaju rasi banatski magarac

Stara planina je planinski masiv u jugoistočnom delu Srbije. Predstavlja jednu od poslednjih regija gde vlasnici i dalje tradicionalno gaje balkanskog magarca u malim krdima koja broje po 10-15 jedinki. Procena brojnosti na osnovu istraživanja Stanišić i sar. (2015a) je da populacija magaraca na Staroj planini (SP)

broji negde između 70 – 100 jedinki. U drugim ruralnim područjima Srbije postoji još lokacija gde se mogu naći magarci, ali njihov broj je mali i najčešće vlasnici drže jednog do dva magarca u gazdinstvu.

Populacija magaraca koja se nalazi u selu Kovilj (KO) na obali reke Dunav, formirana je 2000. godine kada su jedinke balkanskog magarca iz pojedinih regiona Vojvodine premeštene u Kovilj i sada njihovo krdo broji oko 60 priplodno sposobnih magaraca. Tokom leta, magarci se nalaze na ostrvu zvanom Krčedinska ada veličine oko 900 hektara gde se slobodno kreću. Stoga, oni su izolovani tokom sezone parenja. Krčedinska ada je potopljena zimi kada je vodostaj Dunava visok i tada se magarci prebacuju na obalu reke gde se hrane tokom cele zime.

Balkanski magarac na osnovu glavnih morfometrijskih parametara spada u magarce srednje veličine sa prosečnom visinom u grebenu od 104 cm, dubinom grudnog koša od 48 cm, dužinom trupa od 118cm i obimom grudi od 115 cm (Stanišić i sar., 2015a). Balkanski magarac je najčešće sivac, zatim vranac ili boje čokolade (Slike 15 i 16).



Slike 15 i 16. Balkanski magarac

Kod većine grla se uočava jeguljasta pruga duž leđa i krst na grebenu. Takođe, uočava se i rasvetljenost pigmentacije: srebrnasto senčenje raspoređeno ventralno na grudima i abdomenu, duž medijalne strane ekstremiteta i oko njuške i očiju. Pojedina grla imaju tigraste pruge duž ekstremiteta. Dlaka je meka i kratka. Tokom zime dobijaju dlaku koja je duža i sa razvijenom poddlakom. U puladi je dlaka duža pufnasta i meka, naročito na čelu, ujednačene je pigmentacije belo-sive boje, a pri prvoj zameni se menja adultnom kratkom i oštrijom dlakom koja može biti i druge boje. Kao i svi domaći kopitari i magarci su socijalne (društvene) životinje. Karakteriše ih život u krdu vezan za određenu teritoriju. Balkanskog magarca odlikuje miran temperament i sposobnost voljnog učenja te se lako obučava i poslušan je u radu. Plemenit je ali brzo reaguje kako na komande, tako i na nadražaje iz spoljne sredine. Mužjaci imaju veoma izražene seksualne nagone i naglašeno seksualno ponašanje pa su skloni međusobnim odmeravanjima i sukobima. Na staništu se dobro snalaze, lako nalaze svoj oskudan obrok i umeju da se štite od predatora.

Na osnovu poslednjih podataka Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede iz 2010. godine i istraživanja Stanišić i sar. (2015a) trenutno postoji oko 250-300 priplodno sposobnih jedinki rase balkanski magarac, sa vrlo malim brojem muških jedinki (10-15% ukupne populacije). Navedene informacije su u saglasnosti sa podacima sa FAO baze podata DAD-IS (*Domestic Animal Data Information System*) gde je 2014. godine zavedeno 239 priplodno sposobnih jedinki, od toga 13 mužjaka i 226 ženki. Sve do nedavno nije postojalo interesovanje za karakterizaciju ove rase.

Balkanski magarac predstavlja genetički resurs Republike Srbije i nalazi se na listi autohtonih rasa domaćih životinja i ugroženih autohtonih rasa u Republici Srbiji (Glasnik Republike Srbije 2010, 38/10). Fenotipska i molekularno genetička karakterizacija balkanskog magarca predstavlja osnovu neophodnu za definisanje

standarda i karakterizaciju ove rase kao i dalji organizovani uzgoj ove veoma otporne i snažne životinje.

3. Cilj i zadaci

Osnovni cilj ove doktorske disertacije jeste fenotipska i molekularno genetička tipizacija uzoraka populacija balkanskog magaraca u Republici Srbiji utvrđivanjem morfometrijskih, hematoloških i biohemijskih parametara, kao i analizom polimorfizama odabranih genetičkih markera - mikrosatelita i korišćenjem HVR1 regiona mtDNK.

U skladu sa ciljem, definisani su sledeći najvažniji zadaci rada:

1. Odabrati studijsku populaciju reprezentativnu za ispitivanu rasu balkanski magarac koja obuhvata jedinke koji nisu u srodstvu i izvršiti klasifikaciju jedinki prema starosti.
2. Procena populacije i ugroženosti rase, geografska zastupljenost, prikupljanje podataka o migriranju jedinki, ukrštanju, starosna i polna struktura ispitivane populacije;
3. Izvršiti morfometrijska merenja izabranih telesnih parametara.
4. Izvršiti uzimanje uzoraka krvi i ispitati izabrane hematološke, biohemijske i genetičke parametre.
5. Izvršiti statističku obradu dobijenih morfometrijskih, hematoloških i biohemijskih parametara, definisati granične i srednje fiziološke vrednosti za analizirane parametre, i izvršiti uporednu analizu dobijenih vrednosti između starosnih grupa kao i sa vrednostima drugih rasa dostupnih u literaturi.
6. Izvršiti ekstrakciju DNK iz uzoraka krvi i genotipizaciju korišćenjem 17 mikrosatelitskih genetičkih markera uključenih u komercijalni sistem pod nazivom Equine Genotypes Panel 1.1 (Thermo Scientific): *AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6,*

HMS7, LEX3, VHL20) izabranih u skladu sa preporukama ISAG za tipizaciju magaraca. Izvršiti amplifikaciju HVR1 regiona mtDNK.

7. Na osnovu ustanovljenog polimorfizma ispitivanih mikrosatelitskih lokusa utvrditi da li je izabrani set mikrosatelitskih markera odgovarajući za genotipizaciju rase balkanski magarac, proceniti nivo jedarnog genetičkog diverziteta na osnovu ustanovljenog ukupnog broja alela, prosečnog broja alela po lokusu, dobijene i očekivane heterozigotnosti.

8. Ustanoviti odstupanja frekvenci gena od Hardy-Weinberg očekivanja za sve ispitivane lokuse kod rase balkanski magarac.

9. Za sve parove ispitivanih mikrosatelitskih lokusa ispitati da li se nalaze u stanju neravnotežne vezanosti odnosno ustanoviti da li postoje odstupanja od slučajne asocijacije između alela na različitim lokusima.

10. Izvršiti uporednu analizu varijabilnosti svakog ispitivanog mikrosatelitskog lokusa kod rase balkanski magarac sa odabranim rasama magaraca kod kojih je polimorfizam odgovarajućih lokusa prethodno ispitivan.

11. Na osnovu analize nuklearne DNK ustanoviti genetičku strukturu populacije balkanskog magarca u Srbiji.

12. Proceniti stepen genetičkog diverziteta ispitivane populacije balkanskog magarca na nivou mitohondrijskog genoma na osnovu ukupnog broja haplotipova i broja privatnih haplotipova, vrednosti haplotipskog i nukleotidnog diverziteta.

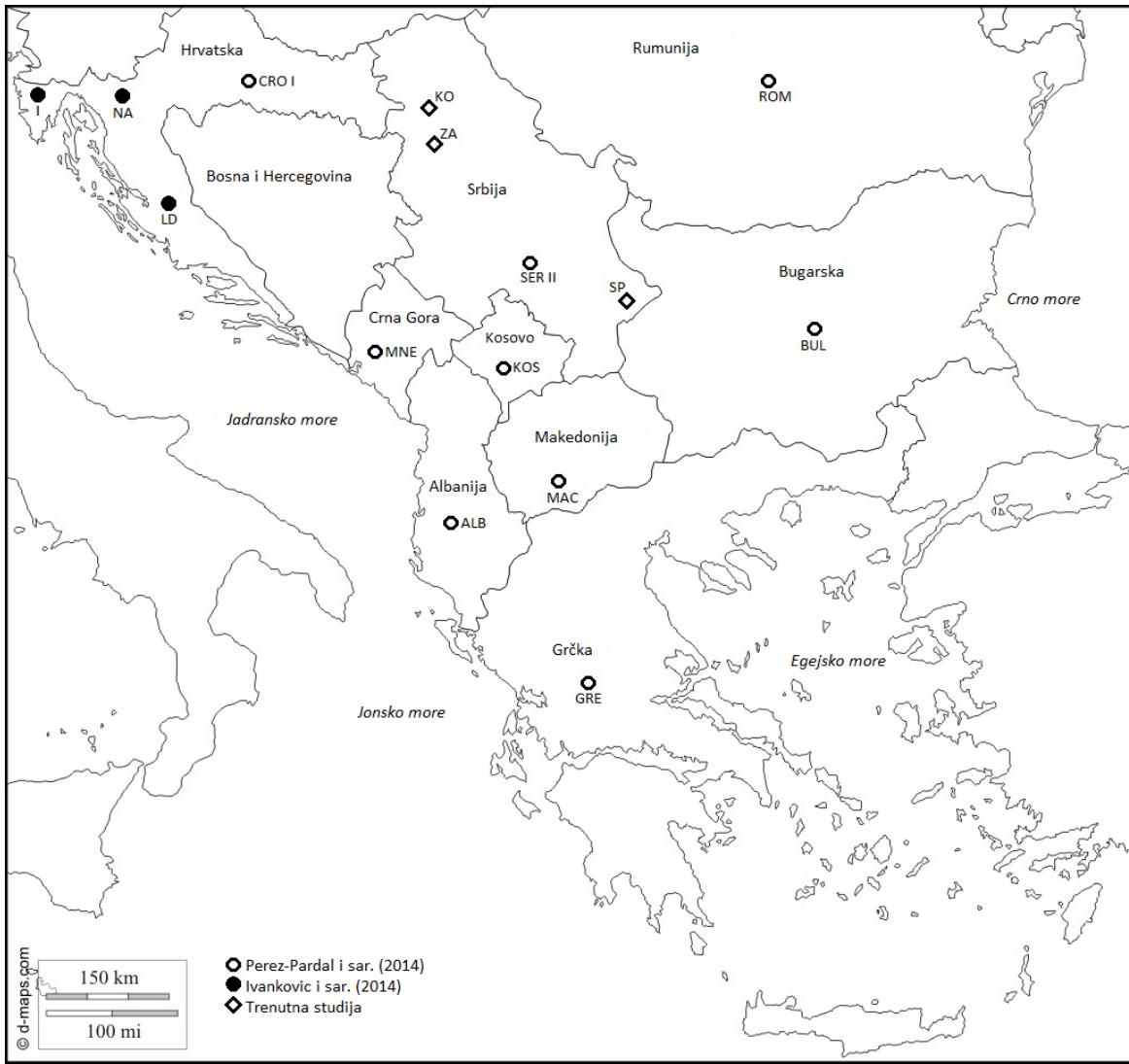
13. Utvrditi genetičke distance između ispitivane populacije balkanskog magarca i drugih odabranih prethodno ispitivanih rasa magaraca na osnovu mtDNK podataka.

14. Utvrditi moguće poreklo i evolutivnu istoriju ispitivane populacije balkanskog magarca kroz filogenetsku i filogeografsku analizu mtDNK sekvenci balkanskog magarca i mtDNK sekvenci magarca dostupnih u javnoj banci gena.

4. Materijal i metod

4.1 Studijska populacija

Fenotipska i genetička karakterizacija rase balkanski magarac na teritoriji Republike Srbije izvršena je ispitivanjem 77 jedinki ove rase. Ispitivana populacija obuhvatila je 7 mužjaka i 70 ženki. Pri analizi morofometrijskih, biohemijskih i hematoloških parametara krvi, odabrane životinje podeljene su u dve starosne grupe. Prva grupa (grupa A) je obuhvatala 22 mlade jedinke od 3 i manje godina starosti, dok je u drugoj (grupa B) bilo 55 jedinki starijih od 3 godine. Najmlađa ispitivana jedinka imala je 18 meseci a najstarija 10 godina. U odabranoj populaciji, magarci nisu bili u srodstvu, tj. prema kriterijumima iz literature (Beja-Pereira i sar., 2004; Bordonaro i sar., 2012; Zhu i sar., 2013; Kefena i sar., 2014; Pérez-Pardal i sar., 2014) isključen je zajednički predak na nivou druge generacije. Kriterijumi koji su uzimani u obzir su različito geografsko poreklo i različite populacije magaraca od različitih vlasnika. Za svakog magarca uključenog u ovo istraživanje uzeti su validni identifikacioni podaci kao što su matični broj, podaci o boji i oznakama, dlaci, polu, poreklu, starosti, kao i podaci o odgajivaču i vlasniku. U Srbiji, najveće populacije magaraca se trenutno nalaze u Specijalnom rezervatu prirode „Zasavica“, u regionu Stare planine i u okolini mesta Kovilj, nadomak Novog Sada (Slika 17). Sa navedenih lokacija ispitano je 41 (Zasavica), 16 (Stara planina), odnosno 20 (Kovilj) jedinki magaraca.



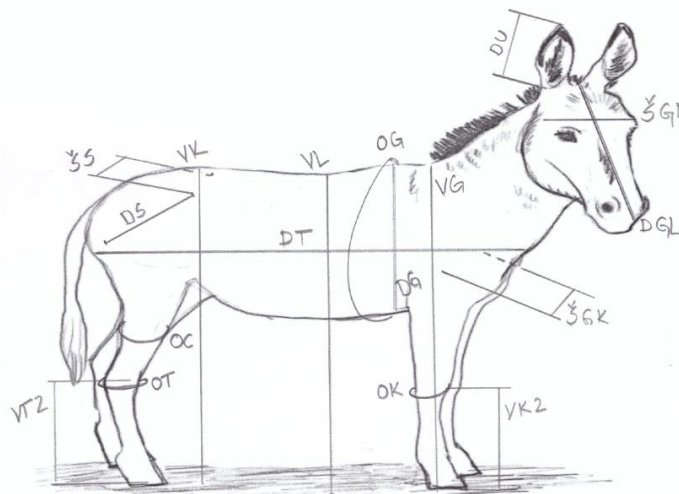
Slika 17. Lokacije populacija balkanskog magarca sa kojih su uzimani uzorci (◇) i zemlje porekla ostalih populacija magaraca koji su korišćeni za poređenje.

○ - oznake za 10 populacija ispitanih u studiji Perez-Pardal i sar. (2014), lokacije populacija su provizorno postavljene; ● - istarska (I), primorsko-dinarska (LD) i severno-jadranska (NA) populacija magaraca okarakterisana od strane Ivanković i sar. (2002).

4.2 Merenje telesnih parametara

Za svakog magarca uključenog u ispitivanje pravljene su zasebne liste u koje su upisivane vrednosti za 18 morfoloških parametara (Slika 18). Vrednosti za šest morfometrijskih parametara su izmerene korišćenjem merne trake i to su: obim grudnog koša, obim karpalnog i tarzalnog zgloba, obim cevanice, dužina uha i dužina glave. Pored toga, korišćen je Lidtinov štap za utvrđivanje vrednosti dodatnih 11 mera: visina u grebenu, visina leđa, visina kuka, dubina grudnog koša, visina karpalnog i tarzalnog zgloba, dužina tela, širina glave, širina grudnog koša, dužina i širina sapi.

- OG - Obim grudi
- OK - Obim karpalnog zgloba
- OT - Obim tarzalnog zgloba
- OC - Obim cevanice
- DU - Dužina uha
- DGL - Dužina glave
- VG - Visina grebena
- VL - Visina leđa
- VK - Visina kuka
- DG - Dubina grudi
- VKZ - Visina karpalnog zgloba
- VTZ - Visina tarzalnog zgloba
- DT - Dužina tela
- ŠGL - Širina glave
- ŠGK - Širina grudnog koša
- DS - Dužina sapi
- ŠS - Širina sapi



Slika 18. Korišćeni telesni parametri u morfometrijskoj karakterizaciji rase balkanski magarac

Procena telesne mase je izvršena na osnovu izmerenih vrednosti obima grudi (OG) i dužine tela (DT), prema formuli Pejić (1996):

$$\text{Telesna masa (kg)} = \frac{\text{OG}^2 * \text{DT}}{11877}$$

4.3 Hematološke i biohemijske analize krvi

Za hematološke i biohemijske analize krv je uzorkovana od 77 klinički zdravih magaraca venepunkcijom vratne vene (*v. jugularis*), u periodu od maja do avgusta 2013. godine. Manipulacija i fiksiranje životinja obavljani su u skladu sa principima poštovanja dobrobiti životinja. Krv je prikupljena u epruvete sa EDTA antikoagulansom za hematološke analize, a u epruvete bez antikoagulansa za ekstrakciju seruma. Odmah nakon uzorkovanja, epruvete su skladištene na ledu. Odvajanje seruma i utvrđivanje hematoloških profila obavljeno je u roku od 12 časova nakon uzimanja uzoraka krvi. Centrifugiranjem na 2.800 obrtaja/min u vremenu od 5 minuta vršeno je odvajanje plazme i seruma iz krvi. Uzorci seruma su čuvani na -20°C pre biohemijske analize.

Kompletna krvna slika dobijena je analizom krvi u automatskom brojaču ćelija (Abacus Junior Vet, Diatron), koristeći unapred formatiran softver za analizu krvi konja. Sledeći hematološki parametri su analizirani su: broj belih krvnih zrnaca (WBC), broj limfocita (LIM), ukupan broj leukocita (MID), broj granulocita (GRA), broj crvenih krvnih zrnaca (RBC), koncentracija hemoglobina (HGB), srednja koncentracija ćelijskog hemoglobina (MCH), prosečni ćelijski volumen (MCV), broj trombocitnih ćelija (PLT), prosečni volumen trombocita (MPV), vrednost hematokrita (HCT), srednja ćelijska koncentracija hemoglobina (MCHC) i odnos ukupnog broja trombocita i zapremine krvi (PCT). Biohemijski profili magaraca uljučenih u istraživanje dobijeni su korišćenjem polu-automatizovanog biohemijskog analizatora (Vet Evolution, BSI) i odgovarajućih setova reagenasa, u skladu sa preporučenim standardnim protokolima. Biohemijska analiza obuhvatila je merenje vrednosti sledećih parametara: aspartat aminotransferaza (AST), alkalna fosfataza (AP), urea, kreatinin, albumin, ukupnih proteini, laktat dehidrogenaza (LDH), kreatin kinaza, g-glutamilttransferaza (GGT), ukupni bilirubin, holesterol, trigliceridi, kalcijuma (Ca) i neorganski fosfor (P).

4.4 Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK izvedena je korišćenjem komercijalnog seta za ekstrakciju totalne genomske DNK iz eukariotskih ćelija (GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit, Thermo Scientific), koji obuhvata sledeće postupke:

1. Pripremanje i obeležavanje čistih, sterilnih pvc-epruveta (1,5ml).
2. Okretanje uzoraka krvi u epruveti (sa EDTA) dok se ugrušak krvi ne rastvori.
3. Dodavanje u epruvetu (1,5ml): 20 μ L proteinaze K i 200 μ L krvi i njihovo mešanje na vorteks aparatu.
4. Dodavanje 400 μ L lizirajućeg rastvora „Lysis solution“ i mešanje na vorteks aparatu.
5. Inkubiranje u vodenom kupatilu na 56°C /30min sa uključenim mešanjem.
6. Dodavanje 200 μ L etanola (96-100%) i mešanje na vorteks aparatu.
7. Ubacivanje pripremljene smeše u spin-koloniku i centrifugiranje 2min na 10700 obrtaja/min.
8. Ponavljanje centrifugiranja u trajanju od 2min na 13000 obrtaja/min po potrebi.
9. Odbacivanje filtrata i prebacivanje filtera u nove epruvete (1,5ml).
10. Dodavanje 500 μ L pufera „Wash Buffer I“ (prethodno rastvoren sa etanolom) i centrifugiranje 2min na 10000 obrtaja/min.
11. Odbacivanje filtrata i vraćanje filtera u ispražnjene epruvete (1,5ml).

12. Dodavanje 500 μ L pufera „Wash Buffer II“ (prethodno rastvoren sa etanolom) i centrifugiranje 5min na maksimalnom broju obrtaja (13000 obrtaja/min).
13. Odbacivanje filtrata i vraćanje filtera u ispražnjene epruvete (1,5ml) i ponovno centrifugiranje 1 min na maksimalnom broju obrtaja (13000 obrtaja/min)
14. Prebacivanje filtera (mini spin kolonice) u sterilne pvc-epruvete (1,5ml).
15. Dodavanje 200 μ L pufera „Elution Buffer“ na membranu, inkubacija u trajanju od 5 min na sobnoj temperaturi.
16. Centrifugiranje 2 min na 10700 obrtaja/min.

Nakon odbacivanja filtera, ovako dobijeni ekstrahovani uzorci DNK čuvani su na temperaturi od -20°C u skladu sa preporukama proizvođača.

4.5 Procena prinosa i čistoće ekstrahovane DNK

Prinos i čistoća ekstrahovane genomske DNK su utvrđeni korišćenjem spektrofotometra „BioPhotometer spectrophotometer system“ (Eppendorf) i merenjem absorbancija na 260 nm i 280 nm radi detekcije proteina i drugih ugljovodoničnih kontaminanata koji absorbuju na talasnim dužinama od 260 nm i manje. Rastvori genomske DNK su razblaženi do koncentracije od 1-2 ng/ μ L, u skladu sa preporukama proizvođača za korišćenje komercijalnog kita za PCR amplifikaciju nuklearnih mikrosatelita „Equine Genotypes Panel 1.1“ (Thermo Scientific).

4.6 Molekularno genetička analiza ispitivanih jedinki rase balkanski magarac primenom mikrosatelitskih lokusa

Genotipizacija jedinki rase balkanski magarac izvršena je korišćenjem nuklearnih mikrosatelita dostupnih u komercijalnom setu pod nazivom „Equine Genotypes Panel 1.1“ (Thermo Scientific). Ovim sistemom se simultano PCR amplifikuje 17 lokusa, a direktni (F) prajmeri za amplifikaciju svakog lokusa su obeleženi fluorescentnim bojama (Tabela 8). Nakon razdvajanja PCR produkata kapilarnom elektroforezom korišćenjem aparata ABI 3100 (Applied Biosystems), laserski sistem detektuje fluorescentno obeležene DNK fragmenate nakon čega se pouzdano utvrđuje njihova dužina poređenjem sa lestvicom (GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard, ThermoFisher).

4.6.1 Karakteristike izabranih nuklearnih mikrosatelita

Mikrosatelitski lokusi koji su analizirani u ovom istraživanju su: *AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *ASB17*, *ASB23*, *CA425*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG7*, *HTG10*, *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *LEX3*, *VHL20*. Svi navedeni mikrosatelitski lokusi se nalaze na ISAG-FAO listi (FAO, 2011) koja daje preporuke o načinu molekularne karakterizacije životinjskih genetičkih resursa. Svi korišćeni lokusi sadrže dinukleotidne motive, i karakteristike svih 17 mikrosatelitskih lokusa kao i njihove lokacije na hromozomima prikazane su u Tabeli 5.

Tabela 5. Karakteristike 17 mikrosatelita izabranih za genotipizaciju rase balkanski magarac.

Lokus	Lokacija	Tip motiva	Referenca	Veličina ponovka (bp)
<i>VHL20</i>	30	di	Van Haeringen et al.(1994)	70-90
<i>HTG4</i>	9	di	Ellegren et al. (1992)	133-139
<i>AHT4</i>	24	di	Binns et al. (1995)	140-166
<i>HMS7</i>	1	di	Guerin et al. (1994)	168-174
<i>HTG6</i>	15	di	Ellegren et al. (1992)	74-82
<i>AHT5</i>	8	di	Binns et al. (1995)	122-146
<i>HMS6</i>	4	di	Guerin et al. (1994)	152-174
<i>ASB23</i>	3	di	Irvin et al. (1998)	183-203
<i>HTG10</i>	21	di	Marklund et al. (1994)	78-100
<i>HTG7</i>	4	di	Marklund et al. (1994)	117-139
<i>HMS3</i>	9	di	Guerin et al. (1994)	141-171
<i>HMS2</i>	10	di	Guerin et al. (1994)	218-238
<i>LEX3</i>	X	di	Coogle et al. (1996)	136-164
<i>CA425</i>	28	di	Eggleston-Stott et al.(1997)	224-238
<i>ASB2</i>	15	di	Breen et al. (1997)	237-269
<i>ASB17</i>	2	di	Breen et al. (1997)	104-116
<i>HMS1</i>	15	di	Guerin et al. (1994)	166-178

Equine Genotypes Panel 1.1 (Thermo Scientific) se sastoji od tri glavne komponente:

1. Equine Genotypes Master Mix (F-851) - PCR master miks predstavlja optimizovanu smešu pufera sa $MgCl_2$, mešavine slobodnih dezoksiribonukleozid trifosfata - dNTP (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i modifikovane „Phusion Hot Start High-Fidelity“ DNK polimerazu (5 U/ μ l);
2. Equine Genotypes Panel 1.1 Primer Mix (F-852) - Mešavina 17 uzvodnih (forward) prajmera obeleženih kovalentno vezanim fluorescentnim obeleživačem za 5' kraj i odgovarajućih neobeleženih nizvodnih (reverse) prajmera;
3. Equine Genotypes Control DNA001 (F-853) - kontrolna DNK (1 ng/ μ l) koja omogućava kontrolu ispravnosti uslova za amplifikaciju i detekciju specifičnih mikrosatelitskih lokusa.

Komponente suu skladu sa preporukama proizvođača čuvane na temperaturi od -20°C do trenutka korišćenja.

4.6.2 PCR amplifikacija mikrosatelitskih lokusa

Amplifikacija svih 17 mikrosatelitskih lokusa izvršena je u jednoj multipleks PCR reakciji prema protokolu preporučenom od strane proizvođača (Thermo Scientific, 2012).

Mastermiks za jedan uzorak imao je zapreminu od 20 μ l i sadržao je 9 μ l Equine Genotypes Master Mix (F-851), 9 μ l Equine Genotypes Panel 1.1 Primer Mix (F-852) i 2 μ l izolata DNK. U okviru našeg istraživanja mastermiks je pripreman u količini za istovremeno ispitivanje 10 uzoraka DNK balkanskog magarca. Pripremljeni mastermiks je kratko promešan na vorteks aparatu i zatim je po 18 μ l preneto u mikroeprove za dalje testiranje 10 uzoraka. U svaku

mikroeprevetu je dodato po 2 μ l prethodno ekstrahovane DNK, koncentracije 2 ng/ μ l , i nakon toga je izvršeno kratko mešanje na vorteks aparatu i kratko centrifugiranje.

Protokol za multipleks PCR amplifikaciju izabranih 17 mikrosatelita prikazan je u Tabeli 6. Za izvođenje PCR reakcije korišćen je MultiGene Gradient (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA). Inicijalni korak koji obuhvata denaturaciju DNK na temperaturi od 98°C u trajanju od 3 minuta takođe služi i za aktivaciju „Phusion Hot Start High-Fidelity“ DNK polimeraze, koja je u sistemu u inaktivnom obliku. Dobijeni PCR produkti čuvani su na temperaturi od 4°C.

Tabela 6. Protokol za multipleks PCR amplifikaciju 17 mikrosatelita u uzorcima DNK balkanskog magarca

1 ciklus		30 ciklusa		1 ciklus
Inicijalni korak	Denaturacija	Vezivanje prajmera	Elongacija	Finalna elongacija
98°C	98°C	60°C	72°C	72°C
3 min	15 sec	75 sec	30 sec	5 min

4.6.3 Kapilarna elektroforeza

Separacija produkata dobijenih PCR amplifikacijom obavljena je postupkom kapilarne elektroforeze. Kapilarna elektroforeza u poređenju sa konvencionalnim elektroforetskim sistemima ima nekoliko važnih prednosti (Budowle i sar., 2000). Postupci pripreme gela i nanošenja uzoraka nisu manuelni, već automatizovani, što umanjuje mogućnost greške. Visoka vrednost odnosa površina/zapremina u kapilari omogućava odvijanje elektroforetske separacije u polju visoke jačine, što doprinosi ubrzanju procesa separacije i poboljšanju

rezolucije tako da se puzdano mogu detektovati i razlike u dužini od 1 bp. Pored toga, svi dobijeni rezultati direktno se kompjuterski memorišu, čime je naknadna analiza podataka znatno olakšana. U uređajima za kapilarnu elektroforezu proces elektroforeze odvija se u kapilari smeštenoj između dva rezervoara ispunjena puferom. U svakom rezervoaru nalazi se po jedna elektroda povezana sa izvorom napajanja. Na distalnom kraju kapilare, suprotnom od mesta injekcije uzorka, nalazi se sistem za detekciju migracije DNK fragmenata. Taj sistem zasniva se na principu laserom-izazvane fluorescencije (LIF - laser-induced fluorescence) i omogućava detekciju PCR produkata u koje je inkorporisan fluorescentni obeleživač, koji je kovalentno vezan za 5' kraj jednog od prajmera. Postupak kapilarne elektroforeze obuhvata sledeće faze: priprema kapilare; punjenje kapilare medijumom za separaciju i puferom; hidrodinamička ili elektrokinetička injekcija uzorka; separacija fragmenata DNK na osnovu dužine; detekcija i na kraju, analiza dobijenih rezultata (Budowle i sar., 2000).

Separacija produkata dobijenih PCR amplifikacijom ispitivanih mikrosatelitskih lokusa u uzorcima rase balkanski magarac izvršena je u ABI 3100 (Applied Biosystems) automatskom sekvenatoru. Svaki uzorak PCR produkata, u zavisnosti od prethodno ustanovljene količine DNK, razblaživan je dodavanjem 20 μ l do 100 μ l dejonizovane vode. Po 1 μ l ovako razblaženih produkata multipleks PCR reakcije prebacivan je u novu mikropruvetu od 0,5 ml. Zatim je u svaku mikropruvetu dodavano po 11,5 μ l formamida i 0.5 μ L GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard, ThermoFisher) i dobijene mešavine su kratko centrifugirane u mikrocentrifugi. Sledeći korak je bio denaturacija putem zagrevanja na 95°C tokom dva minuta, a odmah zatim držanje u ledu tokom tri minuta, nakon čega su uzorci bili pripremljeni za stavljanje u ABI Prism 3100. Za kapilarnu elektroforezu korišćen je set boja Multi-Capillary DS-33 (Dye Set G5) Matrix Standard Set (Applied Biosystems).

4.6.4 Određivanje dužine produkata PCR amplifikacije nuklearnih mikrosatelita

Opseg očekivanih dužina produkata PCR amplifikacije odgovarajućih mikrosatelita, tip i boja fluorescentnih obeleživača korišćenih u ovom istraživanju prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Oznaka i opseg (bp) korišćenih mikrosatelita, tip i boja fluorescentnih obeleživača.

Lokus	Obeleživač	Boja	Opseg očekivanih dužina (bp)
<i>VHL20</i>	FAM	Plava	70-90
<i>HTG4</i>	FAM	Plava	133-139
<i>AHT4</i>	FAM	Plava	140-166
<i>HMS7</i>	FAM	Plava	168-174
<i>HTG6</i>	JOE	Zelena	74-82
<i>AHT5</i>	JOE	Zelena	122-146
<i>HMS6</i>	JOE	Zelena	152-174
<i>ASB23</i>	JOE	Zelena	183-203
<i>HTG10</i>	JOE	Zelena	78-100
<i>HTG7</i>	NED	Žuta	117-139
<i>HMS3</i>	NED	Žuta	141-171
<i>HMS2</i>	NED	Žuta	218-238
<i>LEX3</i>	NED	Žuta	136-164
<i>CA425</i>	ROX	Crvena	224-238
<i>ASB2</i>	ROX	Crvena	237-269
<i>ASB17</i>	ROX	Crvena	104-116
<i>HMS1</i>	ROX	Crvena	166-178

Opseg očekivanih dužina produkata PCR amplifikacije odgovarajućih mikrosatelita koji je definisan od strane proizvođača Equine Genotypes Panel 1.1 (Thermo Scientific), zasnovan je na empirijskim opservacijama dužine alela u okviru brojnih studija genotipizacije izvedenih na ABI PRISM 310, 3100, 3100-Avant ili 3130 Genetic Analyzers (Applied Biosystems) DNK sekvenatorima (Thermo Scientific, 2012). Dužina produkata PCR amplifikacije izabranih mikrosatelitskih markera je u rasponu od 73 do 269 bp, što omogućava uspešnu genotipizaciju čak i delimično degradovanih uzoraka DNK.

Dužina PCR produkata procenjivana je na osnovu poređenja sa odgovarajućom lestvicom koja sadrži DNK fragmenate tačno definisanih dužina, kao i primenom Genotyper® softvera (Applied Biosystems). Dok uzorci prolaze pored fluorescentnog detektora u ABI Prism 3100 sekvenatoru, GeneScan® softver preuzima signal i za svaki određuje dužinu u bp. GeneScan podaci su zatim eksportovani u Genotyper® za dalju obradu.

4.7 Molekularno genetička analiza ispitivanih jedinki rase balkanski magarac na osnovu sekvenci HVR1 regiona (mtDNK)

Za genetičku karakterizaciju rase balkanski magarac korišćen je i mitohondrijski lokus, hipervarijabilni region HVR1. Prajmeri za PCR amplifikaciju ovog lokusa su preuzeti od Beja-Pereira i sar. (2004) koji su korišćeni za spitivanje filogenije magaraca poreklom iz 52 zemlje. Korišćeni su uzvodni (forward) ASSF prajmer 5'- CCCAAGGACTATCAAGGAAG-3' (15386-15406 bp) i nizvodni (reverse) ASSR prajmer 5'-GGAATGGCCCTGAAGAAAG-3' (15847-15865 bp) za amplifikaciju 479 - bp DNK fragmenta HVR1 regiona (pozicije baznih parova prema sekvenci iz Genske Baze br. X97337 , Xu i sar., 1996). Navedeni lokus je PCR amplifikovan kod 49 magaraca (30 uzoraka - ZA, 10 - SP i 9 - KO). PCR

reakcije izvedene su u mastermiksi zapremine 20 μ L koji je sadržavao 2 μ L 10 \times PCR pufera (KAPA Biosystems, SAD), 10 mM dNTP, 10 μ M svakog prajmera, 25 mM MgCl₂, 2 μ L ekstrahovane DNK koncentracije 2ng/ μ l i 0.5 U Taq polimeraze (KAPA Biosystems, USA).

Protokol za reakcije PCR amplifikacije HVR1 regiona u uzorcima DNK prikazan je u Tabeli 8. Za izvođenje PCR reakcije korišćen je MultiGene Gradient (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA). Inicijalni korak koji obuhvata jedan ciklus denaturacije na temperaturi od 98°C u trajanju od 3 minuta je korišćen i u cilju aktivacije Phusion Hot Start High-Fidelity DNK polimerazu, koja je u sistemu u inaktivnom obliku. Dobijeni PCR produkti čuvani su na temperaturi od 4°C do dalje obrade.

Tabela 8. Protokol za reakcije PCR amplifikacije HVR1 regiona u uzorcima DNK rase balkanski magarac

1 ciklus		35 ciklusa		1 ciklus
Inicijalni korak	Denaturacija	Vezivanje prajmera	Elongacija	Finalna elongacija
95°C	95°C	55°C	72°C	72°C
5 min	20 sec	30 sec	30 sec	5 min

PCR produkti su prečišćeni korišćenjem purifikacionog seta QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA). Primarni redosled nukleotida (sekvenciranje) PCR produkata je utvrđen komercijalno, od strane kompanije MacroGen Europe (Netherlands), u jednom 5'-3' pravcu (sa forward prajmerom) metodom BigDye Terminator u automatskom DNK sekvenatoru ABI 3 730 XL (Applied Biosystems).

4.8 Statistička analiza dobijenih podataka

Završni deo istraživanja podrazumevao je obimnu statističku analizu dobijenih podataka, koja je trebala da pruži odgovore na pitanja postavljena u okviru definisanih ciljeva i zadataka ovog istraživanja.

Podaci vezani za telesne mere, hematološke i biohemijske parametre krvi predstavljeni su kroz srednju vrednost, medijanu, kvartalnu vrednost i koeficijent varijacije (CV). Shapiro-Wilk W test je korišćen u cilju procene normalne raspodele podataka, nakon čega je pomoću Levin-ov testa određena homogenost razlike. Promenljive sa normalno distribuiranim podacima i homogenim varijacijama su upoređene između dve starosne grupe t-testom, u suprotnom, korišćen je Mann-Whitney U-test. Sličnost balkanskog magarca sa ostalim rasama magaraca ispitivana je kroz klaster analize, na osnovu udaljenostima po Euclidean-u i Ward-ovom načinu povezivanja. Statističke razlike za pet odabranih morfoloških parametara (visina grebena, dubina grudnog koša, dužina tela, širina grudnog koša, obim grudnog koša) između rasa magaraca određene su korišćenjem t-testa. Razlike su smatrane kao značajane za vrednosti $p < 0.05$. Statistička analiza dobijenih rezultata u eksperimentu je izvedena korišćenjem softverskog paketa STATISTICA v.6 (StatSoft, Inc. , Tulsa, OK , USA).

Za obradu dobijenih molekularnih podataka korišćen je niz preporučenih metoda i softverskih paketa. Za obradu podataka dobijenih iz jedarne DNK korišćeni su sledeći paketi: MICRO-CHECKER 2.2.1 (van Oosterhout i sar., 2004), Arlequin ver. 3.5.2 (Excoffier i sar., 2006), GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008) i STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard i sar., 2000), dok su za obradu mitohondrijskih sekvenci korišćeni paketi Muscle (Edgar, 2004) u paketu MEGA 5.04 (Tamura i sar., 2011), Arlequin ver. 3.5.2, Paleontological Statistics (PAST) ver.3.0 (Hammer i sar., 2001), NETWORK 4.6.1.2 (Bandelt i sar., 1999).

Prisustvo nultih alela na mikrosatelitskim lokusima, potencijalna dominacija kratkih alela i prisustvo „stutter“ alela je testirano korišćenjem paketa MICRO-CHECKER 2.2.1., a statistička značajnost je utvrđena korišćenjem 1000 randomizacija. Parametri genetičkog diverziteta na nivou jedarnog genoma: Prvi korak bio je identifikacija alela, njihovog ukupnog broja (A) i broja efektivnih alela [$A_e = 1/(1 - H_E)$], kao i utvrđivanje učestalosti svakog alela za svaki pojedinačni lokus. Vrednosti dobijene heterozigotnosti (H_o) i očekivane heterozigotnosti (H_E) u analiziranom uzorku populacije balkanskog magarca izračunate su primenom softvera Arlequine ver. 3.5.2 (Excoffier i sar., 2006). Utvrđeno je odstupanje učestalosti genotipova za svaki lokus od očekivanih vrednosti za populacije u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži, uz Bonferoni korekciju za višestruka poređenja (Holm, 1979; Guo i Thompson, 1992). Ustanovljeno je da li su odstupanja od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže u smeru viška ili deficita heterozigota. Neravnotežna vezanost gena ili LD (linkage disequilibrium) za sve parove lokusa procenjivana je testom permutacija (10000 permutacija) primenom softvera GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008).

Vrednosti parametara genetičkog diverziteta upoređivani su sa vrednostima dobijenim prethodnim ispitivanjima korišćenjem istih ili drugačijih molekularnih markera kod različitih rasa magaraca (Jordana i sar., 1999; Aranguren-Mendez i sar., 2001, 2004; Ivankovic i sar., 2002; Blasi i sar., 2005; Ciampolini i sar., 2010; Bordonaro i sar., 2012; Zhu i sar., 2013; Matassino i sar., 2014).

Genetička diferencijacija analiziranih populacija balkanskog magarca na nivou jedarnog i mitohondrijskog genoma je procenjena putem dva pristupa. Prvo, utvrđene su vrednosti parametara genetičke diferencijacije (F_{ST}) za svaki par populacija. Statistička značajnost je utvrđena korišćenjem 1000 permutacija. Korišćen je paket Arlekin Ver. 3.5.2 (Excoffier i sar., 2006). F_{ST} vrednosti su

poslužile i za utvrđivanje broja migranata po generaciji (N_m), kao indirektnog pokazatelja protoka gena u uslovima genetičkog drifta, pretpostavljajući beskonačni ostrvrski model (Slatkin, 1993). N_m vrednosti su utvrđene korišćenjem formula $N_m = 1/4 (1 / F_{ST}-1)$ za jedarne podatke, kao i $N_m = 1/2 (1 / F_{ST}-1)$ za mtDNK podatke. Drugo, obavljena je analiza molekularne varijanse (AMOVA, Excoffier i sar., 2006) u cilju procene distribucije molekularne varijacije unutar i između populacija upotrebom istog softvera. Za jedarni set podataka, korišćene su genetičke distance utvrđene metodom sumiranja kvadratnih razlika u broju ponovaka motiva između mikrosatelitskih lokusa, dok je za mitohondrijske podatke korišćen broj različitih alela. Pored toga, mtDNK podaci su upotrebljeni za tri AMOVA analize. AMOVA I, na osnovu sekvenci mtDNK tri ispitivane populacije magaraca iz Srbije, izvedena je u cilju procene njihove genetičke diferencijacije. U AMOVA II analizi, pored sekvenci dobijenih u ovom istraživanju, korišćeno je 180 objavljenih sekvenci HVR1 regiona mtDNK individua iz 19 populacija magaraca iz Evrope i Afrike. Tu su uključene 132 sekvence iz deset balkanskih populacija magaraca (Perez-Pardal i sar., 2013); tri sekvence iz populacija magaraca iz Hrvatske (Ivanković i sar., 2001); 39 sekvenci iz šest afričkih populacija (Kefena i sar., 2014) i šest sekvenci koje potiču od individua iz dve populacije drevnih afričkih divljih magaraca (Beja-Pereira i sar., 2004). Dodatno, korišćenjem softvera Paleontological Statistics (PAST) ver.3.0 (Hammer i sar., 2001), sumirane su F_{ST} vrednosti (genetičke distance) dobijene analizom populacija (AMOVA II) u višedimenzionalni grafikon (Multidimensional Scaling plot - MDS). Grupe populacija determinisane u MDS analizi su upotrebljene za hijerarhijsku analizu molekularne varijanse (AMOVA III). U hijerarhijskoj AMOVA analizi je predefinisano više grupa populacija, a ukupna molekularna varijansa je podeljena na tri komponente: između grupa

(F_{CT}), između populacija u okviru svake grupe (F_{SC}) i unutar populacija (F_{ST}). Značajnost svih testova je proverena korišćenjem 15.000 permutacija.

Genetička diferencijacija populacija na nivou jedarnog genoma je procenjena i korišćenjem Monte Carlo Markov Chain (MCMC) simulacijom i pomoću Bajesove metode grupisanja na osnovu različitih modela srodnosti individua i modela frekvenci alela. Ovo je tzv. "*model-based clustering*" koji predstavlja kvalitativno drugačiji metod u poređenju sa prethodno korišćenim metodama koje se zasnivaju na koeficijentima genetičke sličnosti/razlika, a njime se utvrđuje optimalni broj nezavisnih genetičkih grupa (K) u uzorku na osnovu genetičkih profila jedinki. Kalkulacije su izvedene korišćenjem softverskog paketa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard i sar., 2000). MCMC simulacije imale su dužine 'zagrevanja lanaca' (*burn-in*) i dužine lanaca (*run length*) od po 1 000 000 iteracija. Deset nezavisnih analiza za svaku pretpostavljenu grupu $K = 1-5$ je izvedeno. Kao model frekvenci alela je korišćen model korelisanih (zavisnih) frekvenci alela, a kao model srodnosti individua - model admiksije. Optimalni broj genetičkih grupa K je utvrđen na dva načina prema uputstvu u programu STRUCTURE, odnosno, izračunavanjem srednjih vrednosti logaritamske verovatnoće za svaku vrednost K , izračunavanjem posteriornih verovatnoća za svaki K , i utvrđivanjem K vrednosti koja ima najmanju posteriornu verovatnoću. Drugi metod, kojim se mogu detektovati i viši nivoi hijerarhijske strukture je metod ΔK objašnjen od strane Evanno i sar. (2005).

Mitohondrijske sekvence su poravnate u programu Muscle (Edgar, 2004) radi utvrđivanja homologije nukleotida. Zatim su upoređivane sa kompletnom mitohondrijskom sekvencom *E. asinus* (Banka Gena br. X97337, Xu i sar., 1996), kao i sa odgovarajućim sekvencama korišćenim u prethodnim istraživanjima (Ivankovic i sar., 2002; Beja-Pereira i sar., 2004; Perez-Pardal i sar., 2013; Kefena i sar., 2014). Filogenetsko stablo (Neighbour Joining -NJ tree) je konstruisano

korišćenjem sekvenci HVR1 regiona iz ovog rada, tri sekvence nubijskog divljeg magarca i tri sekvence somalijskog divljeg magarca (Beja-Pereira i sar., 2004), i sekvence konja kao filogenetski daleke grupe - outgrupe (Banka Gena br. NC_001640, Xu i Arnason, 1994). Za filogenetsku rekonstrukciju korišćen je Kimura 2-parametar model sa 1000 *bootstrapping* replikacija u softverskom paketu MEGA 5.04 (Tamura i sar., 2011). *Bootstrapping* podrška $\geq 75\%$ je smatrana kao dobra, a između 50% i 75% kao srednja podrška.

Filogeografska mreža (Median Joining - MJ network) je konstruisana korišćenjem softverskog paketa NETWORK 4.6.1.2 (Bandelt i sar., 1999) na osnovu 258 sekvenci HVR1 regiona mtDNK, i to 49 sekvenci ispitivane populacije balkanskog magarca, kao i 209 prethodno objavljenih mtDNK sekvenci HVR1 regiona: 132 sekvence jedinki iz deset balkanskih populacija magaraca (Perez-Pardal i sar., 2013); 32 sekvence jedinki iz populacija magaraca iz Hrvatske (Ivanković i sar., 2001); 39 sekvenci magaraca iz šest afričkih populacija (Kefena i sar., 2014) i šest sekvenci koje potiču od jedinki iz dve populacije drevnih afričkih divljih magaraca (Beja-Pereira i sar., 2004)(Tabela 9). Sekvence su skraćene da odgovaraju dužini najkraće raspoložive sekvence (423 bp). Nakon konstruisanja mreže, izvršena korekcija primenom Maximum Parsimony (MP) metode radi uklanjanja retikulacija i rezultujuća mreža je ručno sklapana u svrhu vizuelizacije.

Tabela 9. Veličina uzorka i poreklo populacija koje su korišćene u analizama AMOVA II, AMOVA III i MSD analizi.

Zemlja porekla	Populacije	Oznaka	Br. uzoraka	Referenca
Srbija ¹		SER-I	49	Sadašnje istraživanje
Albanija ¹		ALB	18	Pérez-Pardal i sar. (2014)
Bugarska ¹		BUL	22	Pérez-Pardal i sar. (2014)
Hrvatska ¹		CRO-I	23	Pérez-Pardal i sar. (2014)
Makedonija ¹		MAC	13	Pérez-Pardal i sar. (2014)
Grčka ¹		GRE	22	Pérez-Pardal i sar. (2014)
Kosovo ¹		KOS	5	Pérez-Pardal i sar. (2014)
Crna Gora ¹		MNE	14	Pérez-Pardal i sar. (2014)
Rumunija ¹		ROM	5	Pérez-Pardal i sar. (2014)
Srbija ¹		SER-II	5	Pérez-Pardal i sar. (2014)
Ukrajina ¹		UKR	5	Pérez-Pardal i sar. (2014)
Hrvatska		CRO-II	32	Ivankovic i sar. (2002)
Etiopija	Afar	AF	11	Kefena i sar. (2014)
Etiopija	Hararghe	HR	6	Kefena i sar. (2014)
Etiopija	Sinnar	SI	6	Kefena i sar. (2014)
Etiopija	Abyssinian	AB	5	Kefena i sar. (2014)
Etiopija	Omo	OM	6	Kefena i sar. (2014)
Etiopija	Ogaden	OG	5	Kefena i sar. (2014)
Somalijski divlji magarac ²		SWA	3	Beja-Pereira i sar. (2004)
Nubijski divlji magarac ²		NWA	3	Beja-Pereira i sar. (2004)

¹ – Balkanski magarac; ² – uzorci DNK izumrlih drevnih magaraca

5. Rezultati

5.1. Morfometrijski parametri rase balkanski magarac

Vrednosti 18 telesnih parametara korišćenih za morfometrijsku karakterizaciju rase balkanski magarac (obim grudnog koša, obim karpalnog i tarzalnog zgloba, obim cevanice, dužina uha i dužina glave, visina u grebenu, visina leđa, visinu kuka, dubinu grudnog koša, visina karpalnog i tarzalnog zgloba, dužina tela, širina glave, širina grudnog koša, dužina i širina sapi) su predstavljene u Tabeli 10. Vrednosti ovih parametara pokazuju homogenost ($CV < 30\%$) u obe starosne kategorije. Većina vrednosti telesnih mera magaraca u grupi B (starijih od 3 godine) imala je normalnu raspodelu, za razliku od većine varijabli kod magaraca u grupi A (3 godine i mlađih) kod kojih nije postojala normalna raspodela podataka (Shapiro-Wilk's W test, $P < 0.05$). Između grupe A i B, uočena je značajna razlika ($P < 0.05$) kod četiri od osamnaest parametara tj. kod mera za dužinu tela, dužinu glave, obim grudnog koša i telesne mase.

Tabela 10. Morfometrijski parametri ispitivanih populacija rase balkanski magarac

Telesne mere (cm)	Grupa A				Grupa B				P
	Srednja vrednost	Mediana	IQ	CV (%)	Srednja vrednost	Mediana	IQ	CV (%)	
Visina u grebenu	103.3	103.5	101.0-107.0	5.7	104.9	104.0	99.0-108.5	8.5	0.906
Visina leđa	101.9	101.7	99.0-106.0	5.9	102.8	102.5	97.5-106.7	8.4	0.873
Dubina grudnog koša	47.1	46.5	45.0-51.0	10.4	47.3	46.5	44.0-50.7	9.9	0.859
Visina kuka	106.8	107.0	105.0-111.0	5.0	107.2	106.7	102.0-112.0	7.9	0.731
Visina tarzalnog zgl.	40.7	40.5	39.0-42.0	5.8	41.3	41.0	38.0-44.0	9.2	0.541
Visina karpalnog zgl.	32.0	31.5	30.0-34.0	6.6	32.4	33.0	30.0-34.5	11.7	0.757
Dužina tela	110.3	111.5	107.0-116.0	8.7	117.2	117.0	112.0-121.5	8.2	0.002
Dužina glave (t)	47.6	48.0	45.0-51.0	7.7	49.6	49.7	47.0-52.0	7.3	0.038
Širina glave	21.0	21.0	20.0-22.0	6.8	22.1	21.7	20.7-23.0	12.4	0.145
Dužina uha (t)	26.1	26.0	25.0-27.0	8.2	25.6	25.0	24.0-27.0	8.4	0.318
Dužina sapi	29.4	31.5	25.0-33.0	17.1	29.9	32.0	24.0-35.0	21.3	0.674
Širina sapi	33.7	34.0	33.0-36.0	12.3	35.0	36.0	32.5-38.0	12.5	0.198
Širina grudnog koša	23.9	24.0	23.0-25.0	11.0	24.3	24.2	22.5-27.0	11.9	0.609
Obim grudnog koša	114.2	114.7	112.5-118.0	8.0	119.6	118.5	114.5-124.5	8.8	0.030
Obim karpalnog zgl.	21.0	21.0	20.5-22.0	6.8	21.4	21.0	19.7-22.5	11.5	0.896
Obim tarzalnog zgl.	27.3	27.0	26.0-29.0	7.7	28.6	28.0	27.0-29.0	10.3	0.142
Obim cevanice	23.9	24.0	23.0-25.0	10.7	25.0	25.0	23.7-26.2	12.1	0.275
Telesna masa (kg)	124.9	122.0	111.0-132.0	16.9	143.4	138.5	123.5-155.0	24.8	0.005

Grupa A – magarci starosti <3 godine; Grupa B – magarci starosti >3 godine; IQ – interkvartilna razlika; CV – koeficijent varijacije; (t)

– t test; za analizu preostalih varijabli korišćen je U test; boldovane vrednosti su statistički značajne za $P < 0.05$.

Rezultati t - testa (Tabela 11) su pokazali značajne razlike ($P < 0.01$) kada se pet odabranih telesnih parametara (visina u grebenu, dubina grudnog koša, dužina tela, širina grudnog koša, obim grudnog koša) balkanskog magarca upoređi sa vrednostima istih parametara katalonskog (Folch i Jordana, 1997) i hrvatskih magaraca (Ivankovic i sar., 2000) dostupnim u literaturi (LD - primorsko-dinarski magarac; NA - severno-jadranski magarac; IST - istarski magarac). Poređenjem vrednosti navedenih pet telesnih parametara balkanskog magarca sa albanskom populacijom magaraca (Papa i Kume, 2012) nisu dobijene su značajne razlike u vrednostima dužine tela ($P > 0.05$). Međutim, dobijena je statistički značajna razlika u vrednostima ostala četiri parametara, tj. za dubinu grudnog koša ($P < 0.05$), visinu u grebenu ($P < 0.01$), širinu grudnog koša ($P < 0.01$) i obim grudnog koša ($P < 0.01$).

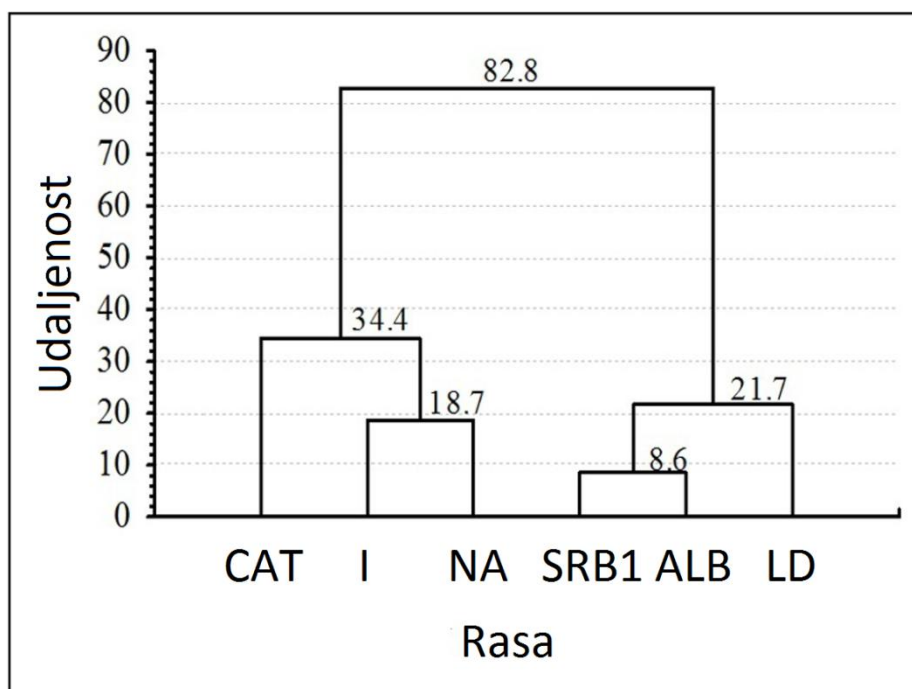
Tabela 11. Poređenje morfometrijskih parametara ispitivanih populacija balkanskog magarca sa dostupnim vrednostima istih parametara drugih rasa magaraca koristeći t-test

Rasa	Visina u grebenu			Dubina grudnog koša			Dužina tela			Širina grudnog koša			Obim grudnog koša		
	SV	t	P	SV	t	P	SV	t	P	SV	t	P	SV	t	P
LD	96.9	7.9	<0.01	42.0	9.5	<0.01	102.6	10.6	<0.01	23.1	3.4	<0.01	112.7	4.3	<0.01
NA	115.2	-11.4	<0.01	50.9	-22.9	<0.01	121.1	-5.0	<0.01	27.3	-9.4	<0.01	131.8	-11.2	<0.01
I	124.0	-20.7	<0.01	54.7	-13.6	<0.01	131.3	-13.6	<0.01	29.8	-17.1	<0.01	144.0	-21.3	<0.01
ALB	107.8	-3.5	<0.01	46.1	2.1	<0.05	113.4	1.5	0.13	26.7	-7.4	<0.01	125.2	-5.8	<0.01
CAT	136.2	-33.6	<0.01	59.3	-21.9	<0.01	143.8	-24.2	<0.01	32.4	-24.8	<0.01	154.7	-30.1	<0.01
BALK	104.5			47.3			117.9			24.3			114.9		

LD - primorsko-dinarski magarac; NA - severno-jadranski magarac; I - istarski magarac (Ivankovic i sar., 2000); ALB - albanski magarci (Papa i Kume, 2012); CAT - katalonski magarac (Folch i Jordana, 1997); SER 1 - balkanski magarac (trenutna studija).

Hijerarhijska klaster analiza vrednosti morfometrijskih parametara rasa magaraca prethodno analiziranih t-testom (Tabela 12) pokazala je izdvajanje dva klastera (Slika 19). Prvi klaster je obuhvatio katalonskog, istarskog i severno-jadranskog

magaraca, dok su drugom klasteru pripali primorsko-dinarski, albanski i balkanski magarac. Najmanja udaljenost je primećena između balkanskog magaraca i albanskih magaraca, dok je na osnovu morfometrijskih podataka najveća divergencija uočena između katalonske i primorsko-dinarske rase magaraca.



Slika 19. Dendrogram koji prikazuje odnose balkanskog magaraca i prethodno opisanih evropskih rasa magaraca, na osnovu klaster analize vrednosti morfometrijskih parametara. LD - primorsko-dinarski magarac; NA - severno-jadranski magarac; IST - istarski magarac (Ivankovic i sar., 2000); ALB - albanski magarci (Papa i Kume, 2012); CAT - katalonski magarac (Folch i Jordana, 1997); BALK - balkanski magarac.

5.2 Hematološki i biohemijski parametri krvi rase balkanski magarac

Hematološki i biohemijski profili ispitivanih jedinki rase balkanski magarac dobijeni su nakon analize krvi 77 klinički zdravih magaraca. Vrednosti parametara koji su dobijeni hematološkom analizom broja belih krvnih zrnaca (WBC), broja limfocita (LIM), ukupnog broja leukocita (MID), broja granulocita (GRA), broja crvenih krvnih zrnaca (RBC), koncentracije hemoglobina (HGB), srednje koncentracije ćelijskog hemoglobina (MCH), prosečnog ćelijskog volumena (MCV), broja trombocitnih ćelija (PLT), prosečnog volumena trombocita (MPV), vrednosti hematokrita (HCT), srednje ćelijske koncentracije hemoglobina (MCHC) i odnosa ukupnog broja trombocita i zapremine krvi (PCT) su prikazani u Tabeli 12. Homogenost dobijenih rezultata je zabeležena kod većine ispitivanih hematoloških parametara, osim kod vrednosti LIM, MID, GRA, PLT i PCT u obe starosne grupe kao i vrednosti WBC za ispitivanu grupu B. Hematološke vrednosti ispitivanih parametara u grupi A su normalno distribuirane. U grupi B, vrednosti parametara WBC, LIM, MID, GRA, PLT i PCT ne prate normalan model distribucije. Rezultati U - testa su pokazali značajno veće ($P < 0.05$) vrednosti parametara WBC, MID i GRA u grupi magaraca do 3 godine starosti u odnosu na odrasle životinje.

Tabela 12. Hematološki parametri ispitivanih populacija balkanskog magarca

Hematološki parametri	Grupa A				Grupa B				P
	Srednja vrednost	Mediana	IQ	CV (%)	Srednja vrednost	Mediana	IQ	CV (%)	
WBC (10 ⁹ /L)	17.8	17.7	16.7-21.6	23.1	15.1	13.9	11.9-17.0	38.2	0.002
LIM (10 ⁹ /L)	6.2	6.5	4.4-7.9	37.5	6.3	6.3	4.6-7.5	41.4	0.892
MID (10 ⁹ /L)	0.6	0.6	0.2-0.8	62.4	0.4	0.2	0.0-0.6	114.0	0.008
GRA (10 ⁹ /L)	10.5	10.1	6.8-13.9	42.0	8.2	7.1	5.3-10.4	55.4	0.017
RBC (10 ¹² /L) (t)	6.6	6.5	6.2-6.9	9.4	6.5	6.5	5.9-7.1	11.6	0.617
HGB (g/L) (t)	117.4	116.5	113.0-124.0	9.7	117.9	118.0	112.0-125.0	8.1	0.839
HCT (L/L) (t)	0.355	0.354	0.343-0.370	8.2	0.360	0.359	0.340-0.380	8.6	0.552
MCV fl	53.5	53.5	50.0-55.0	7.0	54.9	55.0	53.0-57.5	7.0	0.097
MCH pg (t)	17.6	17.8	16.4-18.3	7.4	18.0	17.9	17.1-18.8	6.7	0.184
MCHC g/L	329.6	328.5	322.0-337.0	2.5	323.4	326.5	319.5-332.0	8.7	0.230
PLT (10 ⁹ /L)	257.4	233.5	191.0-335.0	41.5	229.9	237.5	171.0-283.5	39.7	0.414
PCT %	0.1	0.1	0.1-0.2	41.7	0.1	0.1	0.1-0.1	39.9	0.474
MPV fl (t)	6.6	6.6	6.2-7.1	10.2	6.6	6.7	6.2-7.1	8.6	0.854

Grupa A - magarci starosti <3 godine; Grupa B - magarci starosti >3 godine; IQ - interkvartilna razlika; CV - koeficijent varijacije; (t) - t test; za analizu preostalih varijabli korišćen je U test; boldovane vrednosti su statistički značajne za $P < 0.05$.

Vrednosti parametara dobijenih biohemijskom analizom krvi (aspartat aminotransferaza (AST), alkalna fosfataza (AP), urea, kreatinin, albumin, ukupnih proteini, laktat dehidrogenaza (LDH), kreatin kinaza, g-glutamilttransferaza (GGT), ukupni bilirubin, holesterol, trigliceridi, kalcijuma (Ca) i neorganski fosfor (P) su prikazani u Tabeli 14. Biohemijski parametri su pokazali najveću varijabilnost u okviru obe starosne grupe (Tabela 13). Vrednosti pet analita (AST, GGT, holesterol, Ca i P) iz grupe A nisu imale normalnu raspodelu. Suprotno, u grupi B samo su vrednosti četiri analizirana parametra (albumini, ukupni proteini, LDH i GGT) imali normalnu raspodelu. Za navedene biohemijske parametre krvi nije uočen očigledan uticaj starosti, jer nije zabeležena statistički značajna razlika za bilo koji od parametara između dve starosne grupe. Jedini izuzetak je alkalna fosfataza. Kod mladih magaraca vrednosti za alkalnu fosfatazu su značajno veće ($P < 0.05$) u odnosu na vrednosti zabeležene kod odraslih magaraca.

Tabela 13. Biohemijski parametri ispitivanih populacija balkanskog magarca

Biohemijski parametri	Grupa A				Grupa B				P
	Srednja vrednost	Mediana	IQ	CV (%)	Srednja vrednost	Mediana	IQ	CV (%)	
AST U/L	294.1	286.0	195.0-343.0	44.6	246.6	238.0	193.5-299.5	35.1	0.124
AP U/L	578.8	565.0	399.0-714.0	32.9	459.8	436.0	398.0-528.0	27.3	0.017
Urea mmol/L	6.2	5.9	3.9-7.8	37.9	5.3	4.9	4.1-6.0	37.6	0.142
Kreatinin $\mu\text{mol/L}$	66.4	64.0	56.0-81.0	19.2	71.9	67.0	58.5-84.5	29.4	0.338
Albumin g/L (t)	23.9	23.2	20.9-27.1	16.1	26.1	25.7	23.0-29.5	17.0	0.052
Ukupni proteini g/L (t)	64.6	63.0	58.0-73.0	13.5	65.1	64.0	59.0-70.0	12.1	0.841
LDH U/L	432.3	433.5	343.0-514.0	25.1	453.5	443.5	323.0-534.0	34.4	0.841
Kreatin kinaza U/L	188.9	181.0	154.0-241.0	28.7	212.4	183.0	143.0-272.0	52.8	0.736
GGT U/L	23.5	19.5	15.9-30.0	51.8	24.0	23.0	18.1-31.0	36.7	0.388
Ukupni bilirubin $\mu\text{mol/L}$	4.2	3.8	3.4-5.1	30.6	4.3	4.1	3.2-5.1	32.5	0.981
Holesterol mmol/L	1.1	1.1	1.0-1.1	47.4	1.2	1.1	0.7-1.3	63.4	0.845
Trigliceridi mmol/L	0.8	0.8	0.5-1.0	44.9	1.1	0.9	0.4-1.5	89.5	0.146
Ca mmol/L	2.8	2.8	2.7-3.0	12.3	2.9	2.9	2.7-3.1	17.2	0.338
P mmol/L	1.0	0.9	0.7-1.1	31.5	1.0	1.0	0.8-1.2	28.2	0.239

Grupa A - magarci starosti <3 godine; Grupa B - magarci starosti >3 godine; IQ - interkvartilna razlika; CV - koeficijent varijacije; (t) - t test; za analizu preostalih varijabli korišćen je U test; boldovane vrednosti su statistički značajne za $P < 0.05$.

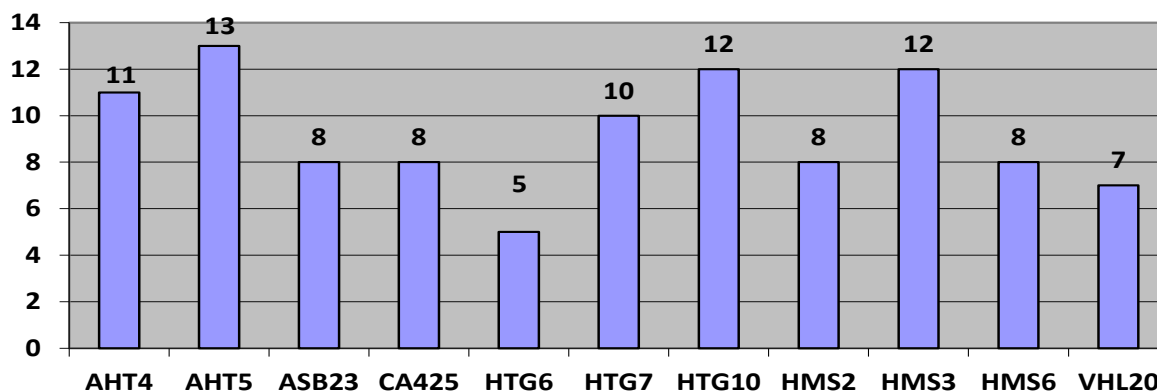
5.3 Molekularno genetičke analize

Spektrofotometrijskom kvantifikacijom ustanovljeno je da je koncentracija DNK u uzorcima iznosila od 25 do 90 ng/ μ l, sa prosekom od 70 ng/uL. DNK izolati svih 77 individua su korišćeni kao matrica za PCR amplifikaciju 17 jedarnih mikrosatelitskih lokusa *AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *ASB17*, *ASB23*, *CA425*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG7*, *HTG10*, *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *LEX3* i *VHL20* komercijalnog seta Equine Genotypes Panel 1.1 (Thermo Scientific), dok je PCR amplifikacija mtDNK HVR1 lokusa obavljena kod 49 magaraca.

5.3.1 Karakteristike jedarnih mikrosatelita

Od 17 analiziranih mikrosatelitskih lokusa, uspešnost PCR amplifikacije i polimorfnost je pokazalo 12 lokusa. Mikrosatelitski lokusi koji su isključeni iz daljih analiza su: *ASB2*, *ASB17*, *HTG4*, *HMS1* i *HMS7*. Lokus *HMS1* se nije amplifikovao ni u jednom uzorku dok je monomorfnost (88bp) kod svih analiziranih jedinki pokazao lokus *ASB17*, odnosno *HMS7* u većini slučajeva. Za lokuse *ASB2* i *HTG4* je ustanovljen mali broj alela u trećini uzoraka dok se kod preostalih jedinki nisu amplifikovali. X-vezani lokus *LEX3* se uspešno amplifikovao kod svih analiziranih jedinki sa ustanovljenih 8 alela od kojih je alel označen kao 7 (162bp) imao najveću učestalost (0.649) među analiziranim markerima. Za dalje analize korišćeno je 11 lokusa, od kojih pet lokusa nije uspelo da se amplifikuje kod pojedinih jedinki. Lokus *ATH4* nije se amplifikovao kod jedne jedinke iz ZA populacije, lokus *CA425* kod dve jedinke iz ZA i dve jedinke iz SP populacije, lokus *HMS2* kod dve jedinke iz SP populacije, *HMS3* kod jedne jedinke iz ZA i dve jedinke iz SP populacije, i lokus *HTG7* kod tri, odnosno dve jedinke iz ZA i SP populacije, respektivno. Lokus *AHT5* se nije amplifikovao kod 34 od 77 magaraca (21 - ZA; 8 - SP i 5 - KO), dok se lokus *HTG6* nije amplifikovao kod 19 magaraca (7 - ZA, 10 - SP, 2 - KO). Broj alela za svaki pojedinačni lokus

koji je korišćen u daljoj analizi kod ispitivane populacije balkanskog magarca prikazan je u Grafikonu 1.



Grafikon 1. Broj alela u svakom pojedinačnom lokusu u analiziranoj populaciji balkanskog magarca.

Nakon analize odabranih 11 lokusa u paketu MICROCHECKER, utvrđeno je da ni na jednom lokusu ne postoji dominacija kratkih alela i da „stutter“ pikovi (produkti amplifikacije kraći ili duži za 1 ili više ponovaka motiva) ne dovode do pogrešne identifikacije dužine alela. Međutim, uočeno je prisustvo nultih alela, i to kod lokusa koji se nisu amplifikovali kod većeg broja jedinki, kao npr. kod lokusa *ATH5* u ZA i SP populaciji, lokusa *HTG6* u SP populaciji, ali i kod lokusa *VHL20* u ZA populaciji koji je, za razliku od prethodno navedenih, uspešno amplifikovao kod svih jedinki. U slučaju lokusa *VHL20* u ZA populaciji, prisustvo nultih alela je posledica sub-strukture ove populacije.

5.3.2 Genetički diverzitet rase balkanski magarac na nivou jedarnog genoma

Ukupan broj alela (A) na 11 mikrosatelitskih lokusa u ispitivanoj populaciji balkanskog magarca bio je 102. Broj alela po lokusu bio je u opsegu od pet (*HTG6*)

do 13 (*AHT5*), sa prosečnim brojem alela po lokusu od 9.27. Učestalosti i dužine u bp za sve ustanovljene alele na svakom pojedinačnom ispitivanom mikrosatelitskom lokusu pokazane su u Tabeli 14. Nomenklatura alela određena je na osnovu interne lestvice.

Tabela 14. Učestalost i dužine ustanovljenih alela po pojedinačnim ispitivanim mikrosatelitskim lokusima u populaciji rase balkanski magarac.

Lokus	Alel	Učestalost	Dužina (bp)*
<i>AHT4</i> (140-166)	1	0.013	142
	2	0.086	146
	3	0.230	148
	4	0.059	150
	5	0.164	152
	6	0.151	154
	7	0.053	156
	8	0.007	158
	9	0.007	160
	10	0.033	164
	11	0.197	166
<i>AHT5</i> (126-146)	1	0.105	122
	2	0.337	124
	3	0.105	126
	4	0.023	128
	5	0.093	130
	6	0.023	132
	7	0.047	134
	8	0.023	136
	9	0.023	138
	10	0.047	140
	11	0.105	142
	12	0.058	144
	13	0.012	146

Lokus	Alel	Učestalost	Dužina (bp)*
<i>ASB23 (176-212)</i>	1	0.006	183
	2	0.013	185
	3	0.058	193
	4	0.286	195
	5	0.117	197
	6	0.201	199
	7	0.175	201
	8	0.143	203

Lokus	Alel	Učestalost	Dužina (bp)*
<i>CA425 (224-248)</i>	1	0.048	224
	2	0.144	226
	3	0.021	228
	4	0.027	230
	5	0.055	232
	6	0.315	234
	7	0.247	236
	8	0.144	238

Lokus	Alel	Učestalost	Dužina (bp)*
<i>HTG6 (73-103)</i>	1	0.034	74
	2	0.259	76
	3	0.147	78
	4	0.466	80
	5	0.095	82

Lokus	Alel	Učestalost	Dužina (bp)*
<i>HTG7 (114-128)</i>	1	0.076	117
	2	0.069	119
	3	0.021	125
	4	0.174	127
	5	0.313	129
	6	0.069	131
	7	0.042	133
	8	0.125	135

Lokus	Alel	Učestalost	Dužina (bp)*
<i>HTG10</i> (83-111)	1	0.006	78
	2	0.032	80
	3	0.026	82
	4	0.110	84
	5	0.013	86
	6	0.019	88
	7	0.195	90
	8	0.234	92
	9	0.253	94
	10	0.065	96
	11	0.032	98
	12	0.013	100

Lokus	Alel	Učestalost	Dužina (bp)*
<i>HMS2</i> (216-238)	1	0.007	218
	2	0.080	222
	3	0.013	224
	4	0.020	226
	5	0.347	228
	6	0.440	230
	7	0.080	236
	8	0.013	238

Lokus	Alel	Učestalost	Dužina (bp)*
<i>HMS3</i> (146-170)	1	0.041	141
	2	0.041	143
	3	0.081	145
	4	0.108	147
	5	0.068	149
	6	0.020	151
	7	0.007	153
	8	0.189	157
	9	0.142	159
	10	0.027	163
	11	0.034	163
	12	0.243	171

Lokus	Alel	Učestalost	Dužina (bp)*
<i>HMS6</i> (154-170)	1	0.455	152
	2	0.182	154
	3	0.052	156
	4	0.065	160
	5	0.032	162
	6	0.006	164
	7	0.019	166
	8	0.188	174

Lokus	Alel	Učestalost	Dužina (bp)*
<i>VHL20</i> (82-102)	1	0.026	70
	2	0.013	72
	3	0.532	74
	4	0.013	84
	6	0.032	86
	7	0.136	88
	8	0.247	90

* dužina alela: broj bp \pm 0,3 - 1,0 bp.

Za pet ispitivanih mikrosatelitskih lokusa (*AHT4*, *ASB23*, *CA425*, *HTG6*, *HMS2*) veličina ustanovljenih alela (bp) je odgovarala očekivanom opsegu dužina za date mikrosatelitske markere. Sedam mikrosatelitskih lokusa (*AHT5*, *HTG7*, *HTG10*, *HMS3*, *HMS6*, *LEX3* i *VHL20*) je pokazalo alele koji su bili van preporučenih opsega od strane proizvođača (Equine Genotypes Panel 1.1, Thermo Scientific). Analizom lokusa *LEX3* (137-161 bp) u uzorcima balkanskog magarca ustanovljen je jedan alel dužine 164 bp odnosno alel čija veličina za dva dinukleotidna ponovka premašuje očekivani opseg. Kod lokusa *AHT5* (126-146 bp), *HTG10* (83-111 bp), *HMS3* (146-170 bp) i *HMS6* (154-170 bp) su nađena po dva alela koji su bila van preporučenog opsega za jedan ili dva dinukleotidna ponovka i to: *AHT5* (122 i 124 bp), *HTG10* (78 i 80 bp), *HMS3* (141 i 143 bp) i *HMS6* (152 i 174 bp). Za dva lokusa *HTG7* (114-128 bp) i *VHL20* (82-102 bp) ustanovljena su po tri alela izvan očekivanog opsega dužina 131, 133, 135 bp i 70, 72, 74 bp, respektivno. Najveći broj alela, 13, pokazao je lokus *AHT5*, kod koga su četiri alela

pokazala veću učestalost među kojima je alel 2 imao najveću učestalost od 0.337. Najveću učestalost pojedinačnog alela u celokupnoj analiziranoj populaciji (nakon isključivanja lokusa *LEX3*) imao je alel 3 na lokusu *VHL20* koja je iznosila 0.532. Lokusi kod kojih takođe postoji značajno visoka učestalost jednog alela u poređenju sa učestalostima ostalih ustanovljenih alela su *HTG6* sa učestanošću alela 4 od 0.460, *HMS2* sa učestanošću alela 6 od 0.440 i *HMS6* sa učestanošću alela 1 od 0.455. Lokusi koji su pokazali najviši polimorfizam i prema broju ustanovljenih alela, 12, i prema distribuciji učestalosti alela su *HTG10* i *HMS3*. Za marker *AHT4* takođe je ustanovljen veliki broj alela, 11, pri čemu je najvišu učestalost od 0.230 ispoljio alel 3.

5.3.3 Odstupanja učestalosti gena od Hardy-Weinberg očekivanja i neravnotežna vezanost parova lokusa u ispitivanim populacijama balkanskog magarca

Efektivni broj alela (A_e), koji predstavlja parametar genetičkog diverziteta koji ne uzima u obzir alele male učestalosti i čija vrednost zavisi od veličine uzorka, iznosio je 4.55 u ukupnom uzorku. Ukupan broj privatnih alela (PA) iznosio je 27, od kojih je najveći broj bio u ZA populaciji (21), zatim u SP populaciji (6), dok u KO populaciji nisu nađeni PA. Lokus sa najviše PA (6) bio je *HMS3* u populaciji ispitivanih magaraca iz Zasavice (Tabela 15). Kod sve tri ispitivane populacije magaraca procenjene vrednosti za H_O i H_E za pojedinačne lokuse bile su visoke, kao i u celom uzorku, $H_O = 0.798$ i $H_E = 0.763$ (Tabela 15). Najviša vrednost $H_O = 0.998$, dobijena je za lokus *HTG10* a najniža vrednost za lokus *HTG6*, iznosila je 0.426. Vrednost H_E bila je u opsegu od 0.648, koliko je iznosila vrednost ovog parametra za marker *VHL20*, do 0.836, što je očekivana heterozigotnost za *AHT4* sa 11 alela.

Na 11 analiziranih mikrosatelitskih lokusa, učestalosti genotipova na 4 lokusa (*AHT4*, *ASB23*, *HMS2* i *HTG7*) su u skladu sa očekivanjima prema Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži, dok na preostalih 7 lokusa postoji značajno odstupanje učestalosti genotipova od Hardy-Weinberg-ovih očekivanja. Značajan deficit heterozigota se primećuje na 3 lokusa (*AHT5*, *HTG6* i *VHL20*) u ZA populaciji i 2 lokusa (*HTG6* i *AHT5*) u SP populaciji magaraca, dok je statistički značajan višak heterozigota u navedene tri populacije ispoljen na po 4 lokusa u ZA i SP populaciji i na 6 lokusa KO populaciji (Tabela 15). Kada se uzmu u obzir svi lokusi, prosečne vrednosti učestalosti genotipova u populacijama ZA i KO značajno odstupaju od očekivanja prema Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži.

Rezultati

Tabela 15. Parametari genetičkog diverziteta na nivou jedarnog genoma ispitivane populacije balkanskog magarca u Srbiji.

Populacija	Lokus												Ukupno
		<i>AHT4</i>	<i>AHT5</i>	<i>ASB23</i>	<i>CA425</i>	<i>HMS2</i>	<i>HMS3</i>	<i>HMS6</i>	<i>HTG6</i>	<i>HTG7</i>	<i>HTG10</i>	<i>VHL20</i>	
ZA	<i>A</i>	9	11	8	8	8	10	8	4	10	11	7	94
	<i>Ae</i>	5.96	8.57	5.41	5.57	3.08	6.69	3.95	3.39	6.36	6.39	2.68	5.28
	<i>PA</i>	-	3	2	-	2	5	3	-	2	2	2	21
	<i>H_O</i>	0.875	0.550	0.902	0.923	0.658	0.900	0.780	0.558	0.868	0.996	0.487	0.773
	<i>H_E</i>	0.832	0.883	0.815	0.820	0.676	0.850	0.747	0.705	0.842	0.843	0.627	0.786
	<i>F_{IS}</i>	-0.052	0.383	-0.108	-0.126	0.026	-0.058	-0.044	0.210	-0.030	-0.188	0.224	0.021
SP	<i>A</i>	10	8	6	7	5	7	5	4	7	9	4	72
	<i>Ae</i>	7.87	6.66	5.51	5.72	4.15	7.13	2.80	7.51	6.51	5.63	3.04	5.68
	<i>PA</i>	2	2	-	-	-	1	-	-	-	1	-	6
	<i>H_O</i>	0.812	0.375	1.000	1.000	0.642	1.000	0.750	0.166	0.928	1.000	0.687	0.760
	<i>H_E</i>	0.872	0.850	0.818	0.825	0.759	0.859	0.643	0.867	0.846	0.822	0.671	0.797
	<i>F_{IS}</i>	0.071	0.575	-0.230	-0.221	0.158	-0.170	-0.172	0.807	-0.101	-0.224	-0.024	0.046
KO	<i>A</i>	7	7	6	6	5	5	5	5	7	6	5	64
	<i>Ae</i>	5.09	3.04	5.23	3.74	2.57	3.14	3.29	2.01	5.06	5.13	2.83	3.74
	<i>PA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>H_O</i>	0.900	0.733	1.000	1.000	0.650	1.000	0.900	0.555	1.000	1.000	0.750	0.863
	<i>H_E</i>	0.803	0.671	0.808	0.733	0.611	0.682	0.696	0.503	0.802	0.805	0.647	0.706
	<i>F_{IS}</i>	-0.123	-0.096	-0.243	-0.376	-0.064	-0.484	-0.302	-0.107	-0.254	-0.250	-0.163	-0.224
Ukupno	<i>A</i>	11	13	8	8	8	12	8	5	10	12	7	102
	<i>Ae</i>	6.10	5.03	5.38	4.81	3.14	4.93	3.28	3.03	5.88	5.65	2.85	4.55
	<i>PA</i>	2	5	2	-	2	6	3	-	2	3	2	27
	<i>H_O</i>	0.862	0.553	0.967	0.974	0.650	0.960	0.810	0.426	0.932	0.998	0.641	0.798
	<i>H_E</i>	0.836	0.801	0.814	0.792	0.682	0.797	0.695	0.670	0.830	0.823	0.648	0.763
	<i>F_{IS}</i>	-0.034	0.287	-0.194	-0.241	0.040	-0.237	-0.173	0.303	-0.128	-0.221	0.012	-0.052

A – broj alela, *Ae* – efektivni broj alela, *PA* – broj privatnih alela, *H_O* – dobijena heterozigotnost, *H_E* – očekivana heterozigotnost, *F_{IS}* – koeficijent inbridinga; boldovane vrednosti su statistički značajne za $P < 0.05$.

Za sve parove lokusa ispitivano je postojanje neravnotežne vezanosti odnosno mereno je odstupanje od slučajne asocijacije između alela na različitim lokusima (Tabela 16). Odstupanja su uočena u 29 od 165 testova, i to u najvećem broju u ZA (16 testova) i KO (10 testova) populaciji. Pokazano je da su u stanju neravnotežne vezanosti sledeći parovi lokusa: *HMS6* i *ASB23*, *HMS6* i *HTG10*, *VHL20* i *HMS3*.

Tabela 16. Neravnotežna vezanost parova ispitivanih mikrosatelitskih lokusa u ispitivanoj populaciji balkanskog magarca

Lokus	<i>AHT</i> 4	<i>AHT</i> 5	<i>ASB2</i> 3	<i>CA</i> 425	<i>HMS2</i>	<i>HMS3</i>	<i>HMS6</i>	<i>HTG6</i>	<i>HTG7</i>	<i>HTG</i> 10	<i>VHL</i> 20
<i>AHT4</i>	*										
<i>AHT5</i>		*									
<i>ASB23</i>			*								
<i>CA425</i>				*							
<i>HMS2</i>					*						
<i>HMS3</i>						*					
<i>HMS6</i>			+				*			+	
<i>HTG6</i>								*			
<i>HTG7</i>									*		
<i>HTG10</i>										*	
<i>VHL20</i>						+					*

5.3.4 Genetički diverzitet ispitivanih populacija balkanskog magarca na nivou mitohondrijskog genoma

Mitohondrijski lokus HVR1 je uspešno PCR amplifikovan kod 49 individua rase balkanski magarac i utvrđen je primarni redosled nukleotida ovog regiona kod svih jedinki. Dobijeni DNK fragmenti su poravnati korišćenjem paketa *Muscle* radi utvrđivanja homologije nukleotida i poravnata dužina ovog regiona je bila 479 bp. U ovom regionu je otkriveno 25 varijabilnih mesta i to 20 „parsimony“ informativnih pozicija i 5 singletona, kao i jedan indel (inercija/delecija) dužine 1 bp. Na osnovu mutacija u ovom regionu, definisano je 19 haplotipova (h1-h19) koji su prijavljeni u gensku bazu podataka i zavedeni pod pristupnim brojevima KR081377-KR081395 (Tabela 17; Stanišić i sar., 2015b-u). Dobijeni haplotipovi su upoređeni sa dostupnim haplotipovima u banci gena i utvrđena je njihova pripadnost jednoj od dve prethodno definisane linije (klade).

Pet haplotipova (h8, h9, h10, h15 i h16) je prijavljeno po prvi put (novi haplotipovi), od kojih su h8 i h15 poticali iz ZA populacije, h10 i h16 iz SP populacije i h9 iz KO populacije ispitivanih magaraca. Haplotip sa najvećom učestalošću u sve tri populacije je h12, koji je bio prisutan kod 14 jedinki. Dodatno, kod ispitivane populacije pronađeno je 14 privatnih haplotipova, 8 u ZA populaciji (h2, h3, h5, h7, h8, h14, h17 i h18), tri u SP populaciji (h10, h13 i h16) i tri u KO populaciji (h1, h9 i h11).

Rezultati

Tabela 17. Haplotipovi dobijeni na osnovu sekvenciranja HVR1 regiona mtDNK, oznaka svakog haplotipa i njihova učestalost u svakoj od tri analizirane populacije kao i u ukupnom uzorku.

GenBank	Cl.	h	Pozicije substituisanih i indel nukleotida unutar mitohondrijskog kontrolnog regiona																							Učestalost haplotipova u populacijama						
			15484	15490	15503	15527	15569	15580	15597	15598	15599	15621	15628	15644	15645	15652	15654	15662	15695	15698	15770	15801	15802	15803	15806	15820	15821	15822	ZA	SP	KO	
			G	C	T	1 bp indel	A	A	T	C	G	A	A	G	A	C	T	A	C	C	T	C	T	A	C	C	G	G				
KR081377	1	1	A	T	C		G	G	.	T	A	.	.	A	.	T	C	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A			0.222	
KR081378	1	2	A	T	C		G	G	.	T	A	.	.	A	.	T	.	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.033			
KR081379	1	3	A	T	C		G	G	.	T	.	G	.	A	.	T	C	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.033			
KR081380	1	4	A	T	C		G	G	.	T	.	G	.	A	.	T	.	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.067		0.111	
KR081381	1	5	A	T	C		G	G	.	T	.	G	.	A	G	T	.	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.033	0.100		
KR081382	1	6	A	T	C		G	G	.	T	.	.	.	A	.	T	.	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.033	0.100		
KR081383	1	7	A	T	C		G	G	.	T	.	.	.	A	G	T	.	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.033			
KR081384	1	8*	A	T	C		G	.	.	T	.	.	.	A	.	T	.	G	.	T	C	T	.	G	T	T	A	A	0.033			
KR081385	1	9*	A	T	C		G	.	.	T	.	G	.	A	G	T	.	G	.	T	T	T	A	A			0.111	
KR081386	2	10*	.	.	.		G	.	C	.	A			0.100	
KR081387	2	11	G			0.222	
KR081388	2	12		0.467	0.300	0.333
KR081389	2	13	A	T			0.100	
KR081390	2	14	A			0.033	
KR081391	2	15*	.	.	.	C		0.067	0.100	
KR081392	2	16*	G			0.100	
KR081393	2	17	C			0.033	
KR081394	2	18	A	.			0.067	
KR081395	2	19	A		0.033	0.200	

Cl. - Klada 1 ili 2; h - haplotip; * - haplotipovi prijavljeni po prvi put.

Relativno visok mtDNK diverzitet je primećen u sve tri populacije magaraca, sa prosečnim vrednostima haplotip i nukleotidnog diverziteta od 0.849 ± 0.087 , odnosno 0.01549 ± 0.008 (Tabela 18).

Tabela 18. Parametri genetičkog diverziteta na nivou mitohondrijskog genoma u ispitivanim populacijama balkanskog magarca (ZA, SP i KO) na teritoriji R. Srbije

Populacija	<i>N</i>	<i>Nhapl</i>	<i>Phapl</i>	<i>Hd</i>	<i>Nd</i>
ZA	30	13	8	0.781 ± 0.077	0.01654 ± 0.008
SP	10	3	3	0.911 ± 0.077	0.00997 ± 0.006
KO	9	3	3	0.857 ± 0.108	0.01998 ± 0.011
Ukupno	49	19	14	0.849 ± 0.087	0.01549 ± 0.008

N - Broj jedinki; *Nhapl* - broj haplotipova; *Phapl* - broj privatnih haplotipova; *Hd* - haplotipski diverzitet; *Nd* - nukleotidni diverzitet

5.3.5 Genetička struktura ispitivane populacije balkanskog magarca

Rezultati dobijeni analizom jedarne i mtDNK su korišćeni za utvrđivanje genetičke strukture (diferencijacije) analiziranih populacija magaraca. Prvi pristup obuhvatao je izračunavanje indeksa genetičke diferencijacije (F_{ST}) između parova populacija. Sve vrednosti F_{ST} za jedarne DNK podatke su bile niske ali statistički značajne (Tabela 219A). Najveća vrednost F_{ST} od 0.031 je nađena između ZA i KO populacija magaraca, dok su vrednosti F_{ST} između ZA i SP kao i KO i SP bile skoro upola manje 0.016 odnosno 0.014. Analizom mtDNK podataka, nije dobijena izrazita genetička diferencijacija između ispitivanih populacija (Tabela 19B). Broj migranata po generaciji između populacija pokazao je visoke vrednosti (7 do 18), dok je broj ženskih migranata po generaciji između populacija bio izuzetno visok (preko 160).

Tabela 19. Vrednosti indeksa genetičke diferencijacije (F_{ST}) između tri ispitivane populacije balkanskog magarca iz Srbije (ZA, SP i KO) na osnovu mikrosatelitskih (77 jedinki)-**A** i mtDNK sekvenci (49 jedinki)-**B**.

A				B			
Populacije	ZA	SP	KO	Populacije	ZA	SP	KO
ZA	-			ZA	-		
SP	0.01618**	-		SP	0.00106	-	
KO	0.03198**	0.01427*	-	KO	0.00172	0.00298	-

*statistička značajnost za $P < 0.05$.

** statistička značajnost za $P < 0.01$.

Drugi pristup u ispitivanju genetičke diferencijacije ispitivanih populacija magaraca obuhvatao je analizu molekularne varijanse (AMOVA) mikrosatelitskih i mtDNK podataka u cilju procene distribucije molekularne varijacije unutar i između populacija. AMOVA analiza mikrosatelitskih podataka (Tabela 20) pokazala je da 108.17% ukupne molekularne varijacije potiče od varijacija između jedinki (F_{IT}) a preostalih 2.55% od varijacije između ispitivanih populacija (F_{ST}) koja je pokazala statističku značajnost ($F_{ST} = 0.025$, $P < 0.01$).

Tabela 20. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) na nivou jedarnog genoma kod tri ispitivane populacije balkanskog magarca iz Srbije (ZA, SP i KO)

	Zbir	Komponente	%	Fiksacioni	P -
Izvor varijacije	kvadrata	varijanse	varijacije	indeksi	vrednost
Između populacija	10.950	0.06793	2.55	$F_{ST}:0.02555^{**}$	0.00198
Između jedinki unutar populacija	170.654	-0.28525	-10.73	$F_{IS}:-0.11008$	1.00000
Između jedinki	221.500	2.87662	108.17	$F_{IT}:-0.08172$	1.00000
Ukupno	403.104	2.65931			

** statistička značajnost za $P < 0.01$

Na osnovu rezultata dobijenih analizom mtDNK, AMOVA I je pokazala (Tabela 21) da je ukupna genetička diferencijacija između ZA, SP i KO populacija magaraca niska ($F_{ST} = 0.00172$) bez statističke značajnosti ($P > 0.05$). U širem kontekstu, analizirajući mtDNK podatke 19 populacija magaraca poreklom iz Evrope i Afrike sa ispitivanim balkanskim magarcima, AMOVA II analiza (Tabela 21) je pokazala nizak procenat molekularne varijanse (21.02%) između poređenih populacija, dok je unutar jedinki istih populacija bio visok procenat (78.98%), sa statistički značajnom vrednosti F_{ST} od 0.2102 ($P = 0.000$).

Tabela 21 Analize molekularne varijanse na nivou mitohondrijskog genoma kod populacija balkanskog magarca i populacija magaraca poreklom iz Evrope i Afrike

Izvor varijacije	s.s.	Zbir kvadrata	Komponente varijanse	% varijacije	Fiksacioni indeksi	P-vrednost
AMOVA I						
Između populacija, unutar grupa	2	0.837	0.00071	0.17		
Unutar populacija	45	18.433	0.40963	99.83		
Ukupno	47	19.271	0.41034		$F_{ST}=0.00172$	0.4000
AMOVA II						
Između populacija, unutar grupa	19	324.211	1.06671	21.02		
Unutar populacija	235	941.749	4.00744	78.98		
Ukupno	254	1265.961	5.07415		$F_{ST}=0.2102^{***}$	0.00000
AMOVA III						
Između grupa	4	251.122	1.5816	27.97	$F_{CI}=0.2797^{***}$	0.00000
Između populacija, unutar grupa	15	73.089	0.06634	1.17	$F_{SC}=0.0163$	0.1779
Unutar populacije	235	941.749	4.00744	70.86		
Ukupno	254	1265.961	5.63811		$F_{ST}=0.2914^{***}$	0.00000

AMOVA I analiza je obuhvatila tri lokalne populacije balkanskih magaraca iz Srbije, ZA, SP i KO.

AMOVA II analiza obuhvatila je 258 jedinki iz 20 drevnih i sadašnjih populacija magaraca sa teritorije Afrike i Evrope: populacije drevnih somalijskih i nubijskih divljih magaraca, Beja-Pereira i sar. (2004); populacija balkanskih magaraca iz Srbije obuhvaćena ovom studijom u koju spadaju tri subpopulacije ZA, SP i KO; 6 populacija etiopskih magaraca ispitanih u studiji Kefena i sar. (2014); populacija magaraca iz Hrvatske, Ivankovic i sar. (2002); 10 populacija balkanskog magarca ispitanih u studiji Perez-Pardal i sar. (2014).

AMOVA III predstavlja hijerarhijsku analizu populacija magaraca koji su predefinisani u 5 grupa na osnovu MDS analize F_{ST} parametara između parova 20 populacija prethodno analiziranih u AMOVA II.

s.s. – stepeni slobode

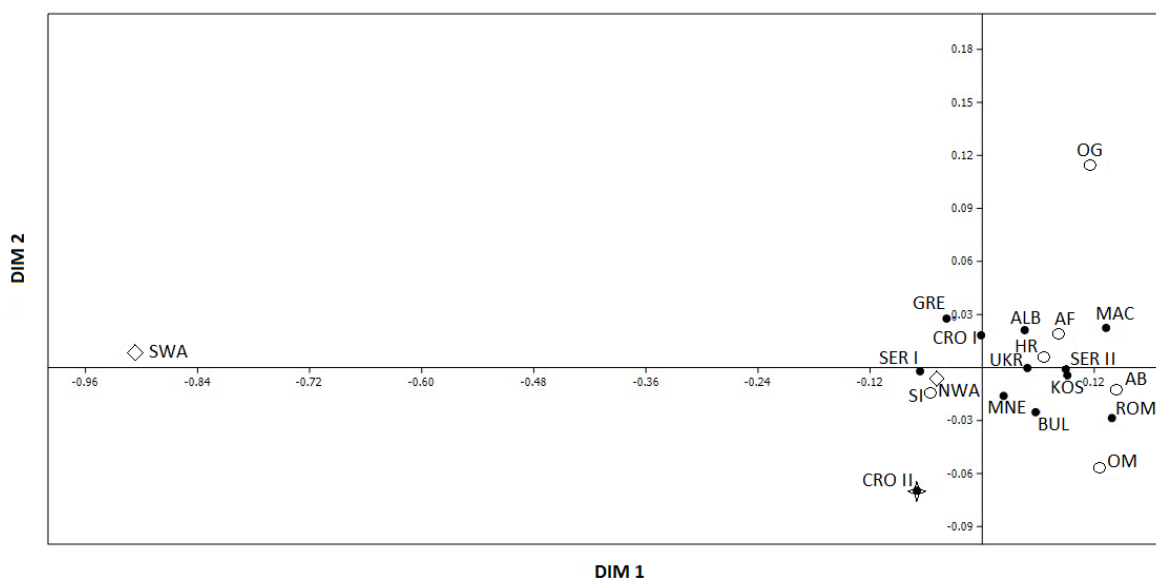
* statistička značajnost za $P < 0.05$.

*** statistička značajnost za $P < 0.001$.

Dobijene vrednosti F_{ST} u analizi AMOVA II sumirane su kroz MDS grafikon gde su populacije formirale pet grupa (Grafikon 2). MtDNK haplotipovi nađeni kod istraživanih balkanskih magaraca iz Srbije grupisani su zajedno sa balkanskim magarcima iz Grčke (Perez-Pardal i sar., 2013), hrvatskim magarcima (Ivankovic i sar., 2002), etiopskim Sinnar magarcima (Kefena i sar., 2014) kao i sa nubijskim divljim magarcima (Beja-Pereira i sar., 2004). Drugoj grupi pripala je većina jedinki iz populacija prethodno nađenih na teritoriji Balkana (Albanija, Bugarska, Hrvatska, Kosovo, Makedonija, Crna Gora i Srbija; Perez-Pardal i sar., 2014), Ukrajine (Perez-Pardal i sar., 2013) i Etiopije (Afar i Hararghe populacije; Kefena i sar., 2014). Treća grupa obuhvatila je jedinke koji potiču iz dve etiopske populacije magaraca (Abyssinian i Omo; Kefena i sar., 2014) i rumunske populacije magaraca (Perez-Pardal i sar., 2013), ukazujući na veći genetički afinitet (sličnost) između ovih populacija. Etiopski Ogaden magarci (Kefena i sar., 2014) i somalijski divlji magarci (Beja-Pereira i sar., 2004) su predstavljali četvrtu odnosno petu, genetički najudaljeniju grupu.

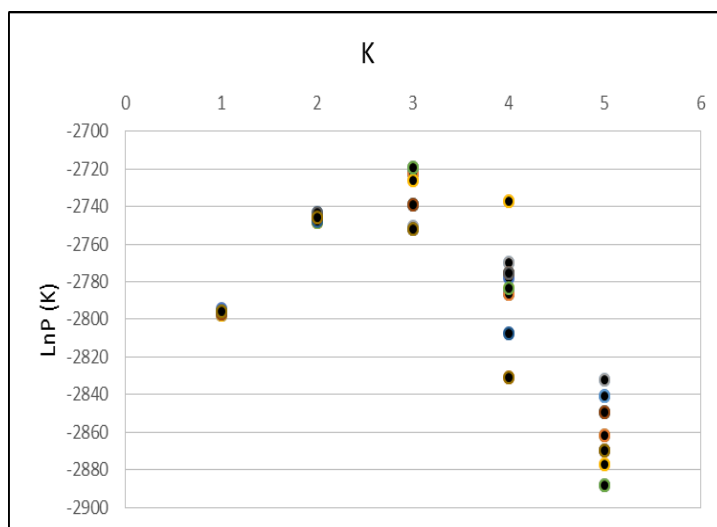
Hijerarhijska analiza molekularne varijanse, AMOVA III, uključila je populacije prethodno grupisane u MDS grafikonu, gde je primećeno da 27.97% molekularne varijanse pripada varijaciji između grupa. Relativno visoka i statistički značajna vrednost F_{CT} od 0.279 ($P = 0.000$), ali i niska i bez statističke značajnosti vrednost F_{SC} (0.0163, $P > 0.05$) ukazuje i potvrđuje pravilno grupisanje ispitivanih populacija u prethodnim analizama (MDS).

Grafikon 2. MDS grafikon dobijen na osnovu F_{ST} distance parova populacija na mitohondrijskom nivou između 20 drevnih i sadašnjih populacija magaraca sa teritorije Afrike i Evrope.

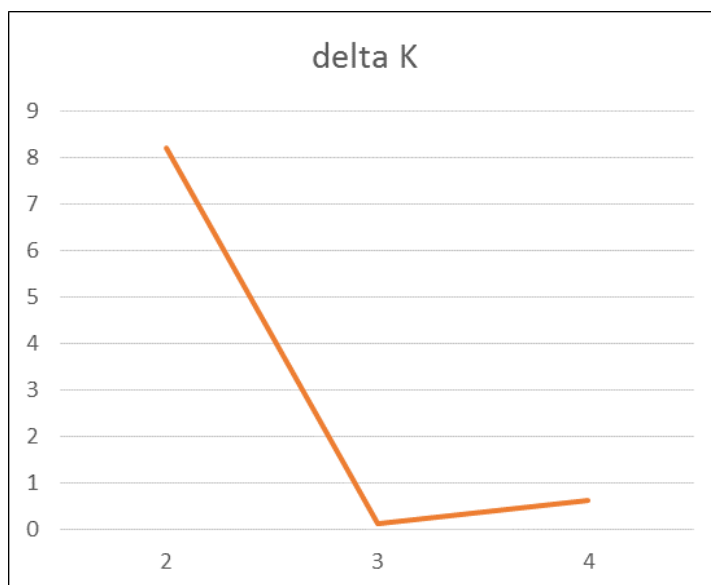


Rezultati STRUCTURE analize za zadati broj genetičkih grupa $K = 2$ do 5 su prikazani na slici 20. Optimalan broj nezavisnih genetičkih grupa (K) je 2, što je utvrđeno na osnovu distribucije log-likelihood vrednosti ($\ln P(K)$ za svaki K) i izračunavanjem posteriornih verovatnoća za svaku srednju vrednost K (Grafikon 3), kao i korišćenjem ΔK metode Evanno i sar. (2005) (Grafikon 4).

Grafikon 3. Distribucija $\text{LnP}(K)$ za $K = 1-5$ dobijenih u STRUCTURE analizi (10 analiza za svaki K)



Grafikon 4. Distribucija ΔK za $K = 1-5$ dobijenih u STRUCTURE analizi (10 analiza za svaki K)

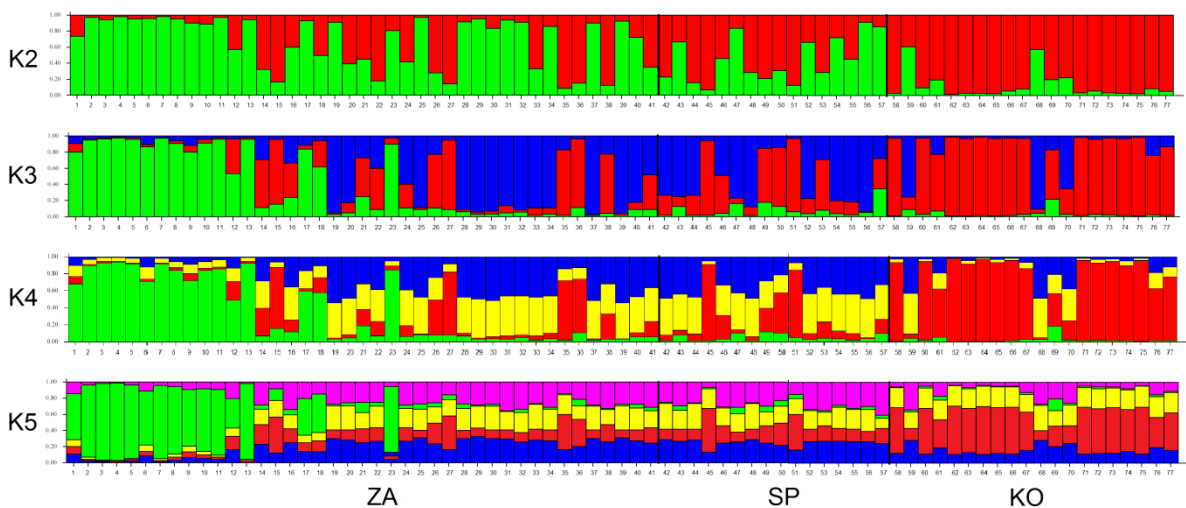


Međutim, dobijene genetičke grupe se nisu poklapale sa ispitivanim populacijama. Naime, obe genetičke grupe su bile zastupljene u svim ispitivanim populacijama, ali u različitom procentu (Slika 20). Tzv. zeleni genski fond je dominirao

u populaciji ZA, a crveni u populaciji KO. Na $K = 3$, uočeno je prisustvo treće, plave genetičke grupe. Približno jedna trećina jedinki iz ZA populacije magaraca je raspoređena u prvu (zelenu) genetičku grupu sa prilično visokom verovatnoćom pripadnosti ($q_i > 0.90$). ZA populacija sadrži i više jedinki snažno dodeljenih drugom (plavom) i trećem (crvenom) genskom pulu. Crveni genski fond preovladava u KO populaciji. Kod magaraca iz SP populacije, nekoliko jedinki je snažno dodeljeno ili plavom ili crvenom genskom pulu, dok je većina magaraca pokazivala hibridno poreklo detektovano na osnovu pripadnosti iste jedinke različitim genskim pulovima, ali sa različitim verovatnoćama pripadnosti. Kod analize sa četiri i pet predpostavljenih grupa ($K=4$; $K=5$), samo jedinke koje pripadaju zelenom genskom pulu u ZA populaciji i crvenom genskom pulu u KO populaciji su ostale snažno dodeljene ovim genetičkim grupama, dok su preostale jedinke pokazivale hibridno poreklo i mešanje različitih genskim pulovima u svojim genetičkim profilima.

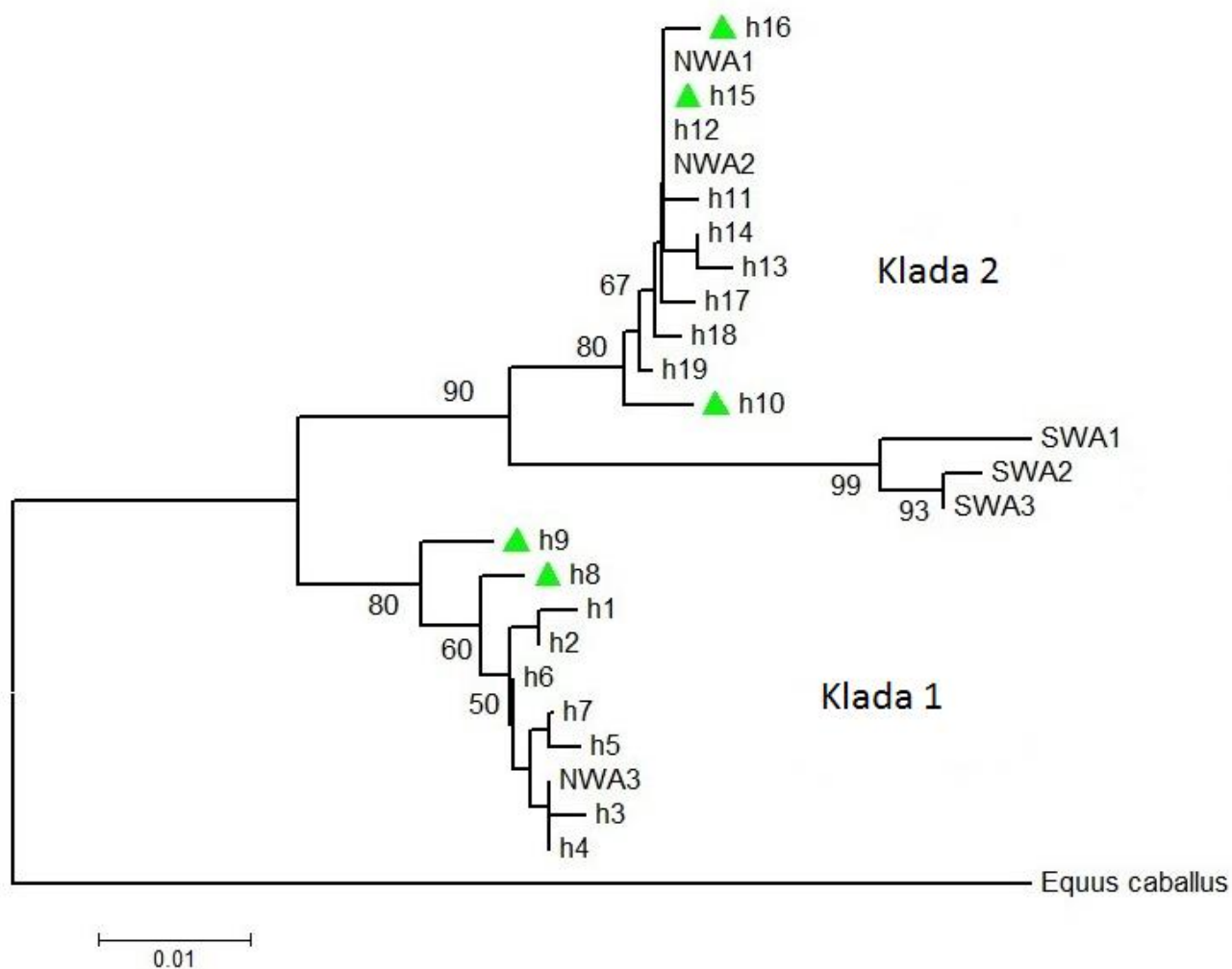
Nakon identifikacije mtDNK haplotipovima koji pripadaju kladi 1 i 2 kod individua koje pripadaju zelenom, crvenom i plavom genskom pulu na $K = 3$, uočeno je da u ZA populaciji jedinke koje pripadaju zelenom genskom pulu su skoro isključivo okarakterisane haplotipovima iz klade 2, dok u KO populaciji jedinke snažno dodeljene crvenom genskom pulu pripadale su podjednako mtDNK haplotipovima iz klade 1 i 2. Preostale jedinke koje su pokazivale hibridno poreklo na nivou jedarnog genoma su pripadale uglavnom kladi 2, i one su u celokupnom uzorku ispitivanih magaraca preovladavale (nalaze se u 35 od ukupno 49 jedinki, 71.43%).

Slika 20. Rezultati STRUCTURE analize za $K=2, 3, 4$ i 5 dobijeni analizom jedarnih mikrosatelitskih lokusa kod 77 jedinki rase balkanski magarac iz populacija ZA, SP i KO poreklom iz Srbije



5.4 Utvrđivanje porekla i odnosa ispitivanih populacija balkanskog magarca sa drugim populacijama magaraca na osnovu filogenetskih i filogeografskih analiza

Na osnovu sekvenci HVR1 regiona mtDNK ispitivanih jedinki rase balkanski magarac i sekvenci nubijskih (NWA) i somalijskih (SWA) divljih magaraca (Beja-Pereira i sar., 2004) konstruisano je filogenetsko NJ stablo (Slika 21) u kojem su predstavljeni filogenetski odnosi ispitivanih individua. NJ stablo je pokazalo dve dobro podržane klade, saglasne sa prethodno prijavljenim kladama 1 i 2 (Beja - Pereira i sar., 2004; Han i sar., 2014). Klada 1 je obuhvatila jedan NWA haplotip i devet haplotipova balkanskog magarca (h1 - h9). Dve dobro podržane sub-klade su primećene u kladi 2. Prva sub-klada se sastojala od tri sekvence somalijskih divljih magaraca, dok je druga obuhvatila dva haplotipa nubijskih divljih magaraca i deset preostalih haplotipova balkanskog magarca (h10 - h19).

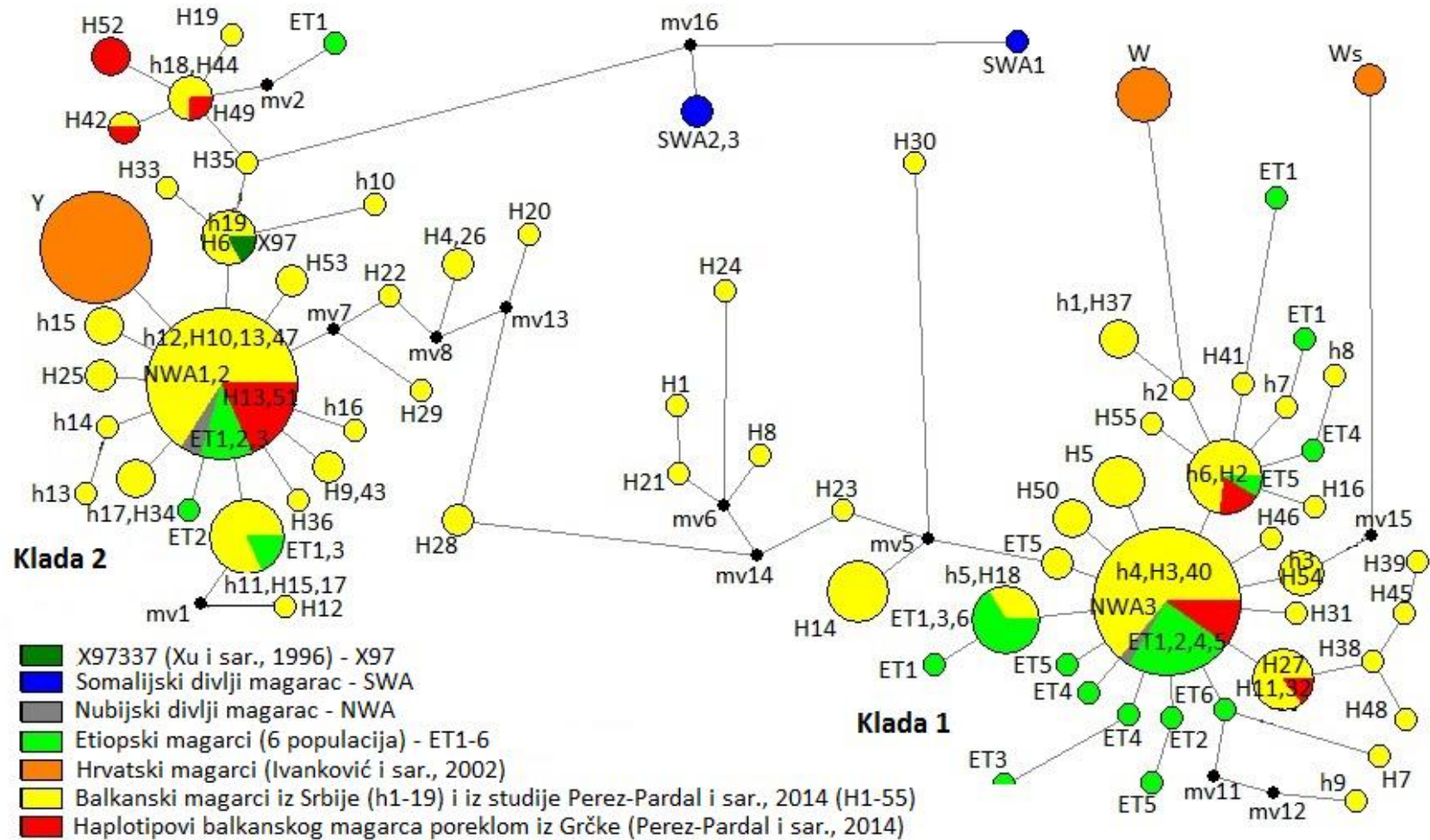


Slika 21. NJ stablo dobijeno analizom mitohondrijskih HVR1 sekvenci ispitivanih balkanskih magaraca i sekvenci drevnih uzoraka nubijskih i somalijskih divljih magaraca.

Mitohondrijski haplotipovi nađeni kod ispitivanih balkanskih magaraca su obeleženi od h1 do h19; Haplotipovi prijavljeni po prvi put su obeleženi sa zelenim trougлом.

Sekvence nubijskih i somalijskih divljih magaraca su obeleženi kao NWA i SWA, respektivno. Sekvenca konja (GenBank NC_001640, Xu i Arnason, 1994) je korišćena kao udaljena srodnička grupa (eng. *outgroup*).

Filogeografska MJ mreža, na kojoj su predstavljeni genealoški odnosi haplotipova ispitivane populacije balkanskog magarca kao i prethodno objavljenih mtDNK sekvenci (Tabela 9; Ivanković i sar., 2001; Beja-Pereira i sar., 2004; Perez-Pardal i sar., 2013; Kefena i sar., 2014) magaraca iz Evrope i Azije, je predstavljena na Slici 22. Haplotipovi nađeni kod ispitivanih balkanskih magaraca bili su organizovani u 2 grupe koje odgovaraju prethodno definisanim kladama 1 i 2 (h1 - h9 u kladi 1, h10 - h19 u kladi 2). Iako su haplotipovi bili zastupljeni u skoro jednakom broju u obe klade, imali su različite učestalosti. Osim toga, oni su zauzeli centralne i prve pericentralne čvorove u obe klade. Njihovo predačko pozicioniranje, međutim, treba uzeti sa rezervom jer su korišćene nešto kraće sekvence u odnosu na druge studije (tj. 423 bp nasuprot 479 bp korišćenih u istraživanju Perez - Pardal i sar , 2013). Upravo iz navedenih razloga nije moguće razlikovati određene haplotipove jasno razdvojene u prethodnim studijama pa su neki od njih predstavljeni unutar istog čvora (npr. h12, dva NWA haplotipa, H10, H13 i H47, kao i haplotipovi iz Afar, Hararghe i Sinnar populacije magaraca koji su predstavljeni zajednički u predačkom čvoru klade 2), ali su i neke geneološke veze između ispitivanih balkanskih magaraca i etiopskih haplotipova ostale nerazjašnjene. Devet haplotipova istraživanih balkanskih magaraca su jedinstveni i činili su centralne i pericentralne čvorove u obe klade, ali i tranzicione čvorove ka drugim izvedenim haplotipovima u kladi 1 (h2 i h7).



Slika 22. Filogeografska MJ mreža formirana na osnovu analize 258 mtDNK sekvenci iz 20 populacija današnjih i izumrlih rasa magaraca poreklom sa evropskog i afričkog kontinenta. Etiopske populacije magaraca: Afar (ET1), Hararghe (ET2), Sinnar (ET3), Abyssinian (ET4), Omo (ET5) i Ogaden (ET6); veličina krugova je proporcionalna broju jedinki.

Veliki broj haplotipova balkanskih magaraca iz klade 2 su predstavljeni kao prvi pericentralni čvorovi koji su nastali od predačkih haplotipova pozicioniranih u centralnom čvoru, sa genetičkom razlikom od jedne mutacije. Isto je uočeno i kod haplotipa Y koji je detektovan kod magaraca iz Hrvatske (Ivanković i sar., 2002).

Tri sub-klade su otkrivene u kladi 2 od kojih su u jednoj svrstani haplotipovi nađeni u Albaniji, Bugarskoj, Hrvatskoj, Srbiji i Etiopiji (Afar i Sinnar populacije); druga je obuhvatila haplotipove iz Albanije, Hrvatske, Srbije i referentnu sekvencu mtDNK magarca iz Evrope, a treća je predstavljena kao najveća i najdivergentnija linija koja se sastojala od haplotipova poreklom iz Grčke, Bugarske, Hrvatske, Crne Gore i jednog haplotipa iz Etiopije (Afar). Sub-klade, sa druge strane, bile su češće u kladi 1. One su obuhvatale haplotipove koji su pripadali isključivo populacijama balkanskog magarca, populacijama magaraca iz Etiopije, ili su obuhvatali i balkanske i etiopske haplotipove. Većina haplotipova iz ispitivane populacije balkanskog magarca (h1, h2, h6, h7 i h8) iz klade 1 su pripala najvećoj sub-kladi, koja je pored navednih haplotipova obuhvatala i haplotipove iz Grčke, Albanije, Bugarske, Hrvatske, Makedonije, Rumunije i Etiopije (Afar, Abissinian i Omo). Dva hrvatska haplotipa W i Ws iz studije Ivanković i sar., (2002) su predstavljeni kao pericentralni čvorovi u dve nezavisne sub-linije.

Etiopski haplotipovi su generalno pomešani sa haplotipovima iz drugih ispitivanih populacija. Međutim, u kladi 1 su prisutni divergentniji haplotipovi koji su organizovani u nezavisne čisto etiopske sublinije, sublinije u mešovitom sastavu (balkanske i etiopske populacije) ili su pokazivali genetičku udaljenost od jedne mutacije od predačkih haplotipova klade 1. U kladi 2 su bile prisutne samo tri etiopske populacije magaraca (Afar, Hararghe i Sinnar) od kojih je Afar populacija pokazivala najveću divergenciju. S druge strane, haplotipovi koji su povezivali kladu 1 i 2 su poticali iz populacijama Albanije, Hrvatske i Bugarske i jednim haplotipom poreklom iz Etiopije (Omo).

6. Diskusija

U cilju boljeg razumevanja koncepta, metodološkog pristupa i korišćenih tehnika u ovom istraživanju, prvi korak bi bio obrazloženje eksperimentalnog dizajna studije tj. argumentovano objašnjenje odabira kriterijuma za formiranje studijske populacije, odabira morfometrijskih, hematoloških i biohemijskih parametara, izbora uzoraka za ekstrakciju DNK kao i izbora nuklearnih mikrosatelitskih i mtDNK markera.

Prema literaturi, istraživanja koja obuhvataju procenu genetičkog diverziteta i diferencijacije jedne rase na nivou nuklearne i mitohondrijske DNK, studijska populacija bi trebalo da se sastoji od jedinki koje nisu u srodstvu (Beja-Pereira i sar., 2004; Bordonaro i sar., 2012; Zhu i sar., 2013; Pérez-Pardal i sar., 2013; Kefena i sar., 2014). U ovu studiju uključeno je 77 jedinki balkanskog magarca sa tri geografska lokaliteta, za koje postoji prateća dokumentacija koja ukazuje na to da nemaju zajedničkog pretka najmanje na nivou druge generacije. Prema dostupnoj literaturi, u različitim studijama korišten je različit broj magaraca. Naime, Ivanković i sar. (2002) su koristili od 23 do 27 jedinki za svaku od tri ispitivane rase hrvatskih magaraca, Kefena i sar. (2014) su za karakterizaciju 6 populacija domaćih etiopskih magaraca koristili 39 uzoraka (tj. 5 do 11 jedinki po populaciji), Matassino i sar. (2014) su uzorkovali 50 odnosno 85 jedinki za karakterizaciju amiata i viterbese rasa. S obzirom da je prema FAO bazi podataka (DAD-IS) registrovano 239 priplodno zrelih jedinki balkanskog magaraca (13 mužjaka i 226 ženki), izabrani uzorak od 77 jedinki balkanskog magarca (41 jedinki iz Zasavice), 16 jedinki sa Stare planine i 20 jedinki iz Kovilja) se može smatrati reprezentativnim za fenotipsku i genetičku karakterizaciju ove rase.

Kao uzorak za ekstrakciju DNK korišćena je periferna krv, koja predstavlja najčešće korišćeni uzorak u većini genetičkih studija kod domaćih životinja. Iako uzorkovanje krvi može biti tehnički zahtevno, jedan od razloga korišćenja krvi kao

uzorka je i hematološka i biohemijska analiza krvi koja je sastavni deo ovog istraživanja.

Odabir 18 morfometrijskih parametara se bazirao na literaturnim podacima za različite rase magaraca, a sve u cilju dobijanja detaljnijih podataka koji se mogu uporediti sa rezultatima prethodno morfometrijski analiziranih rasa. Tako je u studiji Folch i Jordana (1997) izmereno 26 morfometrijskih parametara za biometrijske analize katalonskog magarca; Ivanković i sar. (2000) su koristili 11 morfometrijskih parametara za karakterizaciju primorsko-dinarskog, severno-jadranskog i istarskog magarca. Za fenotipsku karakterizaciju 6 populacija etiopskih magaraca, Kefena i sar. (2011) su upotreбили 12 telesnih mera, dok za albansku populaciju magaraca (Papa i Kume, 2012) postoje podaci za 6 telesnih mera. Podaci dobijeni na osnovu merenja 18 morfometrijskih parametara pružaju veoma detaljan prikaz veličine balkanskog magarca, i to mladih (mlađih od 3 godine) i zrelih (starijih od 3 godine) jedinki koje se mogu uporediti sa drugim opisanim rasama. Primarna podela ispitivanih magaraca na dve starosne grupe izvršena je radi formiranja referentnih telesnih mera kod mladih i odraslih jedinki, a koja bi ubuduće služila za praćenje razvoja i ocenu fenotipskih odlika balkanskog magarca. U prilog navedenom grupisanju ispitivane populacije magaraca govori to da dosadašnja hematološka i biohemijska ispitivanja na magarcima (Folch i sar., 1997; Jordana i sar., 1998; Mori i sar., 2003; Dugat i sar., 2010; Alberghina i sar., 2012; Girardi i sar., 2013) su pokazala da nakon poređenja rezultata analiza krvi između polova ne postoje značajne razlike, dok su uočene razlike u hematološkim i biohemijskim profilima krvi između starosnih kategorija magaraca (Zinkl i sar., 1990; Folch i sar., 1997; Caldin i sar., 2005) i konja (Satue i sar., 2009).

U cilju genotipizacije rase balkanski magarac korišćeno je 17 mikrosatelitskih lokusa u dostupnom komercijalnom sistemu pod nazivom

Equine Genotypes Panel 1.1 (Thermo Scientific). Mikrosatelitski lokusi koji su analizirani u ovom istraživanju su: *AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *ASB17*, *ASB23*, *CA425*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG7*, *HTG10*, *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *LEX3*, *VHL20*. Navedeni mikrosatelitski lokusi predstavljaju panel namenjen za genotipizaciju konja koji su prvobitno obuhvatali 12 mikrosatelitskih lokusa uvedenih od strane Međunarodnog društva za genetiku životinja (ISAG - International Society for Animal Genetics) koji su rutinski korišćeni za individualnu identifikaciju i testiranje porekla (Zabek i Fornal, 2009; Van de Goor i sar., 2010; 2011; Lenstra i sar., 2012). Pored dvanaest standardnih mikrosatelitnih lokusa (*AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *HTG10*, *HTG4*, *VHL20*, *ASB17* i *ASB23*) kod konja su u upotrebi još pet dodatnih lokusa (*HTG6*, *HTG7*, *CA425*, *HMS1* i *LEX3*) usvojenih 2012. godine (Georgescu i Costache, 2012; Fornal i sar., 2013). Osim za konje, za druge ekvide ne postoje komercijalno dostupni paneli. FAO je 2011. godine objavio preporuke o načinu molekularne karakterizacije životinjskih genetičkih resursa u kome se nalaze paneli mikrosatelita za genotipizaciju konja i magaraca. Panel za genetičku karakterizaciju rasa magaraca je skoro u potpunosti preuzet od konja, pa se u populaciono genetičkim i forenzičkim ispitivanjima koja uključuju magarca koristi većina mikrosatelitskih lokusa iz preporučenog panela konja. Naime, jedno od pozitivnih svojstava mikrosatelita je činjenica da su ovi markeri često očuvani i identični između srodnih taksona i na taj način se mogu široko i uspešno primeniti u studijama konzervacije (Rosenbom i sar., 2011). Mnoge studije su već potvrdile da su mikrosatelitske sekvence često očuvane i slične kod različitih životinjskih vrsta pa čak i unutar familija, naročito kod kopitara (Beja-Pereira i sar., 2004). Pojedinačno amplifikovani, navedeni lokusi su se pokazali kao adekvatni za testiranje porekla i individualnu identifikaciju kod magaraca (Jordana i sar., 1999; Aranguren-Mendez i sar., 2001; Ivankovic i sar., 2002; Blasi i sar., 2005; Ciampolini i sar., 2007; Bordonaro i sar., 2012; Zhu i sar., 2013; Matassino i sar., 2014, Jordana i sar., 2015; Rosenbom i sar., 2015). Pored toga

što je izbor markera u skladu sa kriterijumima koje je FAO definisao za genotipizaciju rasa magaraca, po prvi put je upotrebljen komercijalni panel mikrosatelita za konje u svrhu tipizacije magaraca. Validacija ovakvog standardizovanog sistema kod genotipizacije balkanskog magarca omogućava dobijanje validnih, uporedivih i reproducibilnih rezultata. Dodatno, navedeni mikrosateliti su pojedinačno korišćeni u većini studija vezanih za genotipizaciju magaraca (Jordana i sar., 1999; Aranguren-Mendez i sar., 2001; Ivankovic i sar., 2002; Blasi i sar., 2005; Ciampolini i sar., 2007; Bordonaro i sar., 2012; Zhu i sar., 2013; Matassino i sar., 2014, Jordana i sar., 2015; Rosenbom i sar., 2015) što omogućava adekvatnu komparaciju dobijenih rezultata.

U protekle tri decenije, analiza mtDNK markera predstavlja nezaobilazni korak u molekularnim studijama kod životinja (Galtier i sar., 2009). Kada je u pitanju izbor mtDNK markera, hipervarijabilni region HVR1 je najčešće upotrebljni marker u studijama koje su vršene kod ljudi (Davidović i sar., 2015) i životinja, tj. kod magaraca (Beja-Pereira i sar., 2004; Chen i sar., 2006; Pellicchia i sar., 2007; Lei i sar., 2007; Zhang i sar., 2010; Kimura i sar., 2011; Perez-Pardal i sar., 2013; Kefena i sar., 2014) jer se odlikuje višom stopom mutacija u odnosu na kodirajući region te stoga koristi za istraživanja i na nižim taksonomskim nivoima kao i na nivou populacija. Fragment od 479bp koji se nalazi između 15386-15865bp mtDNK su koristili i Beja-Pereira i sar. (2004) u svom istraživanju filogenije magaraca poreklom iz 52 zemlje. U navedenoj studiji, analizirani su i fragmenti HVR1 regiona poreklom od izumrlih somalijskih i nubijskih divljih magaraca koji su, između ostalog, od velikog značaja za utvrđivanje porekla analizirane populacije rase balkanski magarac. S obzirom da je studija a samim tim i metodologija Beja-Pereira i sar. (2004) bila među prvim sprovedenim na velikom broju uzoraka poreklom sa više kontinenata, kasnije studije o diverzitetu i poreklu magaraca bazirane na mtDNK markerima, koristile su isti region za

karakterizaciju različitih rasa magaraca (Chen i sar., 2006; Pellecchia i sar., 2007; Lei i sar., 2007; Zhang i sar., 2010; Kimura i sar., 2011; Perez-Pardal i sar., 2013; Kefena i sar., 2014). Korišćena metodologija u cilju analize mtDNK ispitivane rase balkanski magarac omogućila je komparativnu analizu rezultata sa 19 populacija izumrlih i današnjih rasa magaraca poreklom iz Evrope i Afrike.

Poređenje nuklearnih i mtDNK profila ispitivane rase balkanski magarac omogućava sticanje boljeg uvida u demografske, genetičke i druge procese koji su delovali na populacije ove rase tokom vremena, a naročito zbog toga što ovi molekularni markeri imaju različite šablone nasleđivanja (biparentalno nasuprot maternalnog), tako da se mogu prati i porediti ne samo promene populacije kao celine već i promene koje se odnose samo na žensku liniju. Pored toga, iako se zaključci o evolutivnoj istoriji nekog taksona mogu izvoditi i samo na osnovu varijabilnosti mtDNK sekvenci savremenih individua primenom filogeografskog pristupa, poređenje mtDNK sekvenci ispitivane rase balkanski magarac i drugih danas živećih rasa magaraca sa izumrlim pripadnicima ove rase omogućava izvođenje pouzdanijih zaključaka o poreklu i diversifikaciji rase. Ovakva metodologija može radikalno promeniti pristup očuvanju biodiverziteta domaćih životinja u budućnosti (Bruford i sar., 2003). Ispitivana populacija rase balkanski magarac je upravo analizirana korišćenjem nuklearnih i mtDNK sekvenci, i mtDNK sekvence su zatim poređene sa sekvecama koje su dostupne u banci gena a koje su detektovane ne samo kod savremenih već i kod drevnih individua, što ukazuje na sistematičnost i sveobuhvatnost u donošenju zaključaka vezanih za genetički diverzitet, filogenetske i filogeografske odnose kod ove rase.

6.1 Fenotipska karakterizacija rase balkanski magarac

6.1.1 Morfometrijski parametri ispitivanih populacija balkanskog magarca

Morfometrijska karakterizacija je nezaobilazan postupak u sprovođenju fenotipske karakterizacije jedne rase, obzirom da su morfološke odlike jedne rase odraz bioekoloških selekcijskih uticaja i/ili istorijskih događaja (Kefena i sar., 2011). Morfometrijska karakterizacija rase balkanski magarac izvršena je merenjem 18 telesnih parametara, a dobijene vrednosti su upoređivane između dve starosne grupe (A, <3 godine i B, 3 i više godina starosti) ispitivanih magaraca. Izmerene vrednosti telesnih parametara u obe grupe pokazale su veliku homogenost ($5.08\% \leq CV \leq 24.8\%$) za sve tri ispitivane populacije (ZA - Zasavica, SP - Stara planina i KO - Kovilj). Ispoljena homogenost telesnih mera ukazuje na uniformnost morfometrijskih parametara jedinki koje pripadaju rasi balkanski magarac. Na osnovu analize telesnih mera hrvatske populacije magaraca, Ivanković i sar. (2000) su izdvojili tri rase magaraca gde su u svakoj rasi jedinice pokazivale homogenost telesnih mera ($1.1 \leq CV \leq 30.9$). Slični rezultati su dobijeni u istraživanju Kefena i sar. (2011) gde je po prvi put ispitivano 12 telesnih parametara kod 6 populacija etiopskih magaraca, gde su jedinice koje potiču iz istih populacija pokazivale veliku homogenost ($2.3\% \leq CV \leq 9.7\%$). Uticaj na vrednosti telesnih mera može biti multifaktorijalan: ekogeografski položaj, ishrana i način držanja (Riva i sar., 2004). U odnosu na navedene faktore, ispitivani magarci sa sva tri lokaliteta držani su u sličnim uslovima. Magarci koji su poticali iz A starosne grupe bili su većinom starosti između 2 do 3 godine. Nakon tri godine starosti, magarci dostižu vrednosti telesnih parametara i konstituciju koja im je genetički predodređena. Statistički značajne razlike izmerenih telesnih mera između ispitivanih starosnih grupa balkanskog magarca su uočene za vrednosti dužine tela, dužine glave, obima grudnog koša i telesne mase. S obzirom da ne postoji statistička razlika u

vrednostima mera koje su u vezi sa visinom različitih topografskih tačaka, možemo reći da uočena statistički značajna razlika za vrednosti dužine tela, dužine glave, obima grudnog koša je očekivana i odražava razliku u telesnoj konstituciji mladih i adultnih grla. Vrednosti telesne mase su određivane na osnovu izmerenih vrednosti dužine tela i obima grudnog koša, pa sama promena navedenih parametara dovela je do promene i u telesnoj masi.

Na osnovu dostupnih podataka iz literature, odabrano je pet telesnih mera (visina grebena, dubina grudnog koša, dužina tela, širina grudnog koša, obim grudnog koša) koje su upoređivane sa telesnim merama magaraca iz Hrvatske (Ivankovic i sar., 2000), Albanije (Papa i Kume, 2012) i Španije (Folch i Jordana, 1997). Statistički značajne razlike za navedene parametre su uočene i prilikom poređenja balkanskog magarca sa katalonskim magarcem, hrvatskim rasama magaraca (istarski, primorsko-dinarski i severno-jadranski) i albanskim magarcima. Između balkanskih i albanskih magaraca samo jedna vrednost (dužina tela) od pet analiziranih nije imala statistički značajnu razliku. Navedena diferencijacija između upoređenih rasa magaraca potvrđena je klaster analizom, gde je najveća morfološka sličnost (najmanja distanca) primećena između balkanskog magarca i albanskih magaraca. Morfološka sličnost između balkanskih i albanskih magaraca se može pripisati geografskoj blizini ove dve rase i preklapanju njihovih staništa. Kada se uporede srednje vrednosti morfometrijskih parametara balkanskog magarca sa dostupnim podacima za pojedine rase evropskih magaraca (Folch i Jordana, 1997; Ivankovic i sar., 2000; Papa i Kume, 2012), balkanski magarac spada u rase srednje veličine. Međutim, u poređenju sa podacima telesnih mera za 6 populacija etiopskih magaraca (Kefena i sar., 2011), balkanski magarac ima u proseku veću vrednost analiziranih morfometrijskih parametara od 5 populacija etiopskih magaraca, gde samo sinner populacija magaraca ima veće srednje vrednosti telesnih mera. Na osnovu normalne

distribucije vrednosti morfoloških parametara ispitivanih jedinki, kao i statistički značajne morfološke razlike u odnosu na upoređene rase magaraca, dobijene vrednosti telesnih mera za balkanskog magarca se mogu koristiti kao referentne.

6.1.2 Hematološki i biohemijski parametri ispitivanih populacija balkanskog magarca

U ovom poglavlju opisani su dobijeni podaci o hematološkim i biohemijskim profilima krvi ispitivanih jedinki, sa ciljem što boljeg sagledavanja metaboličkog statusa, kliničke slike i odgovora na terapije kod rase balkanski magarac.

Vrednosti hematoloških parametara kod ispitivane populacije balkanskog magarca su u saglasnosti sa rezultatima hematoloških istraživanja sprovedenih na magarcima u Severnoj Americi (Zinkl i sar., 1990), Velikoj Britaniji (French i Patrick, 1995), Španiji (Folch i sar., 1997) i Italiji (Caldin i sar., 2005). Od 13 hematoloških parametara, tri su pokazala statistički značajnu razliku ($P < 0.05$) između grupe A i B. Vrednosti za broj belih krvnih zrnaca (WBC), ukupan broj leukocita (MID) i broj granulocita (GRA) su bile manje kod starijih magaraca, dok broj limfocita (LYM) nije bio promenjen. Slične vrednosti za belu krvnu lozu dobili su Folch i sar. (1997) kada su analizirali hematološke parametre kod katalonskog magarca, gde je broj leukocita statistički bio manji kod zrelih jedinki, dok je broj monocita i bazofila ostao nepromenjen. Trend smanjenja broja ćelija bele krvne loze kod zdravih odraslih magaraca, sa neznatnim odstupanjima, zabeležen je i u studijama Zinkl i sar. (1990) kod severnoameričke populacije magaraca, i Caldin i sar. (2005) kod ragusana rase magaraca. Razlika u broju ćelija bele krvne loze između starosnih kategorija se objašnjava kao posledica starenja, tj. smanjenja sposobnosti ćelija da se regenerišu (Fermaglich i Horohov, 2002). Neznatna odstupanja su u vrednostima za broj eozinofila (u ovoj studiji parametar MID).

Naime, uvećane vrednosti za broj eozinofila kod odraslih magaraca ($P < 0.05$) zabeležene su kod američke populacije magaraca (Zinkl i sar., 1990), lama (Fowler i Zinkl, 1989) i nekih rasa konja (Satue i sar., 2009). Nalazi uvećanog broja eozinofila kod odraslih jedinki ekvida mogu se pripisati promenama u imunološkom odgovoru usled starenja i/ili većoj izloženosti alergenima ili parazitima (Satue i sar., 2009). Smanjen broj eozinofila kod odraslih jedinki u većini studija odražava malu infestaciju parazitima (Folch i sa., 1997), tj. većina ispitivanih jedinki u istraživanjima je bila podvrgnuta redovnom tretmanu protiv parazita, što je slučaj i sa ispitivanom populacijom balkanskog magarca.

Značajne razlike u vrednostima parametara crvene krvne loze nisu primećene između dve starosne grupe kod balkanskih magaraca, što je u saglasnosti sa istraživanjima French i Patrick (1995), Folch i sar. (1997) i Caldin i sar. (2005). U ranijim hematološkim istraživanjima na magarcima, Brown i Cross (1969) i Zinkl i sar. (1990) ukazano je na statistički značajno smanjenje broja eritrocita kod starijih magaraca, i veći broj manjih eritrocita (mikrocitoza) kod mađih jedinki što su pripisivali deficitu gvožđa. Uzimajući u obzir da se rezultati iz ove studije slažu sa novijim hematološkim istraživanjima (Caldin i sar., 2005; Etana i sar., 2011; Tesfaye i sar., 2014), razlike u rezultatima drugih istraživana se mogu pripisati malom broju analiziranih životinja i statistički neadekvatno obrađenim podacima (Folch i sar., 1997).

Rezultati analize biohemijskih parametara ispitivane populacije balkanskog magarca su u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija (Zinkl i sar., 1990; French i Patrick, 1995; Mori i sar., 2003; Caldin i sar., 2005; Yakubu i Chafe, 2008; Dugat i sar., 2010; Alberghina i sar., 2012; Sow i sar., 2012; Girardi i sar., 2013; Tesfaye i sar., 2014) i imaju vrednosti koje su u opsegu postojećih referentnih vrednosti za magarce. Statistički značajna razlika ($P < 0.05$) u vrednostima biohemijskih parametara između dve starosne grupe balkanskog magarca

pronađena je samo za alkalnu fosfatazu. Identične rezultate za uvećanje vrednosti alkalne fosfataze kod mladih jedinki dobili su Zinkl i sar. (1990) kod severnoameričke populacije magaraca, Caldin i sar. (2005) kod ragusana magaraca, Pitel i sar. (2006) kod dve francuske rase magaraca (*Normand* i *Cotentin*), kao i Girardi i sar. (2013) kod pega rase magaraca. Suprotno navedenim studijama, u istraživanju biohemijskih profila na preko 4.000 magaraca u Velikoj Britaniji, French i Patrick (1995) nisu primetili razliku u vrednostima biohemijskih parametra između starosnih grupa.

Razlog ovih neslaganja može se objasniti činjenicom da uvećana vrednost alkalne fosfataze može nastati kao posledica intenzivnog metabolizma kostiju tokom rasta, koja se smanjuje tokom godina (Girardi i sar., 2013). Za razliku od rezultata dobijenih u ovoj studiji za balkanskog magaca, kod drugih rasa magaraca zabeleženo je uvećanje vrednosti kod 3 i više biohemijskih parametara (Jordana i sar., 1998; Mori i sar., 2003; Caldon i sar., 2005; Sow i sar., 2012; Girardi i sa., 2013). U tim studijama, najšće promene su u vezi sa vrednostima glikemije, koje su u direktnoj vezi sa unosom hrane, ali i sa uticajem stresa ili načina čuvanja krvi nakon uzorkovanja (Kaneko i sar., 1997; Meyer i sar., 1998). U ovoj studiji, serum je neposredno po uzimanju odvajan od eritrocita i zamrzavan, da bi se sprečio kontakt glukoze i eritrocita pri kojem se degradira glukoza. Produženi kontakt eritrocita sa serumom smanjuje koncentraciju glukoze i do 10% po satu (Kaneko i sar., 1997). Razlike u vrednostima drugih biohemijskih parametara se objašnjavaju kroz efekte menadžmentske prakse, među kojima se najčešće navode razlike u ishrani analiziranih rasa magaraca (napr., sastav paše). Fiziološka stanja kao što su graviditet ili laktacija kod ženki mogu uticati na vrednosti analiziranih parametara (Mori i sar., 2003).

6.2 Genetički diverzitet ispitivanih populacija balkanskog magarca u Srbiji

6.2.1 Parametri genetičke raznovrsnosti: ukupan broj alela, broj alela po pojedinačnim lokusima i frekvence alela

U ispitivanoj populaciji balkanskog magarca, od 17 analiziranih mikrosatelitskih lokusa iz komercijalnog seta za konje, 5 lokusa (*ASB2*, *ASB17*, *HMS1*, *HMS7* i *HTG4*) je bilo isključeno iz daljih analiza, što je uobičajeno u studijama ovog tipa (Jordana i sar., 1999; Aranguren-Mendez i sar., 2001; Ciampolini i sar., 2007; Matassino i sar., 2014; Rosenbom i sar., 2014; Jordana i sar., 2015). U ovoj studiji, nakon amplifikacije lokusa *ASB2* i *HTG4* ustanovljen je mali broj alela (manji od 3) kod trećine ispitivanih magaraca dok se kod preostalih magaraca nisu amplifikovali. Mali broj alela u okviru lokusa *ASB2* je zabeležen i u prethodnim studijama, i to 2 alela u analizi italijanske rase amiata magaraca predstavljene sa 50 jedinki (Ciampolini i sar., 2007), dok se u analizi genetičkog diverziteta pet rasa španskih magaraca (Aranguren-Mendez i sar., 2001) nije amplifikovao ni kod jedne od 513 ispitivanih jedinki. Slične rezultate za lokus *HTG4* dobili su Matassino i sar. (2014) u istraživanju na amiata i viterbeze rasama magaraca, gde je na navedenom lokusu detektovano 3 alela kod 135 ispitivanih jedinki. Lokus *HMS1* se nije amplifikovao u uzorcima ispitivane populacije balkanskog magarca. Ovaj lokus je pokazao malu polimorfnost (4 alela) u studiji Ciampolini i sar. (2007) kod 50 amiata magaraca, dok je bio monomorfan kod 5 španskih rasa magaraca (513 jedinki, Aranguren-Mendez i sar., 2001). Lokus *HMS7* se pokazao kao monomorfan kod ispitivanih balkanskih magaraca, što je u saglasnosti sa ispitivanjem velike populacije američkih (350) i evropskih (476) magaraca (Jordana i sar., 2015) gde je lokus *HMS7* takođe isključen iz daljih analiza. Peti lokus koji se pokazao kao monomorfan kod svih ispitivanih jedinki balkanskog magarca je *ASB17*. Za ovaj lokus ne postoje podaci koji govore da je

prethodno korišćen u studijama genetičkog diverziteta, određivanja roditeljstva i individualne identifikacije kod magaraca (Arangueres-Mendez i sar., 2001; Ivankovic i sar., 2002; Ciampolini i sar., 2007; Bordonaro i sar., 2012; Zhu i sar., 2013; Matassino i sar., 2014; Rosenbom i sar., 2014; Jordana i sar., 2015), stoga, ostaje da se utvrdi upotrebljivost lokusa *ASB17* za navedene analize kod različitih rasa magaraca.

Analizom parametara genetičke raznovrsnosti (ukupan broj alela, broj alela po pojedinačnim lokusima i frekvence alela) mikrosatelita najčešće korišćenih za genotipizaciju ekvida (Rosenbom i sar., 2012), dobijeni su visoki nivoi genetičkog diverziteta kod sve tri ispitivane populacije balkanskog magarca, kao i u ukupnom uzorku. Ukupan broj alela kod balkanskog magarca iznosio je 102 prosečnim brojem alela od 9.27 po lokusu, tj. u ZA populaciji 8.54, u SP populaciji 6.54 i KO populaciji 5.81 (Rezultati, Tabela 15). U istraživanju (Jordana i sar., 2015) koje je obuhvatilo 350 magaraca iz 11 zemalja Južne Amerike i 476 magaraca iz 11 rasa poreklom iz četiri mediteranske zemlje (Italija - 3; Grčka - 1; Portugal - 1; Španija - 6) za 14 analiziranih mikrosatelitskih markera dobijeno je 98 alela i prosečan broj alela po lokusu 7. Kada se pogledaju pojedinačno analizirane populacije, populacija magaraca iz Urugvaja imala je namanji broj alela (3.57) a najveći populacija sa Kube (5.7). Rosenbom i sar. (2014) su procenjivali stepen genetičkog diverziteta magaraca poreklom iz 8 zemalja koja predstavljaju tri hipotetička centra domestikacije magaraca: severoistok Afrike (Etiopija, Sudan i Egipat), Arapsko poluostrvo (Oman i Jemen) i Bliski istok (Sirija, Turska i Jordan). Korišćenjem 15 mikrosatelitskih lokusa kod navedenih populacija (129 jedinki) pronađeno je ukupno 120 alela, odnosno prosečan broj alela po lokusu 8. Kod kineske jangjuang rase magaraca, Zhu i sar. (2013) su ispitivali polimorfnost 12 mikrosatelita kod 65 jedinki i dobili ukupan broj od 82 alela i prosečan broj alela od 6.83. Prosečan broj alela po lokusu u drugim studijama kod rasa magaraca sa

Sicilije 6.07 (108 jedinki, Bordonaro i sar., 2012), amiata magaraca 5.61 (50 jedinki, Ciampolini i sar., 2007) i 5.94 (50 jedinki, Matassino i sar., 2014), viterbese magaraca 6.25 (85 jedinki, Matassino i sar., 2014), hrvatskih magaraca 7 (75 jedinki, Ivanković i sar., 2002), kao i kod katalonskog 7.7 (98 jedinki, Jordana i sar., 1999) i drugih španskih rasa 7.2 (513 jedinki, Arangures-Mendez i sar., 2001) pokazali su znatno manje vrednosti kada se uporede sa vrednostima dobijenim kod balkanskog magarca.

Poređenjem broja alela po pojedinačnim lokusima kod ispitivanih balkanskih magaraca, najmanji broj alela (5) nađen je na lokusu *HTG6* a najveći (13) na lokusu *AHT5*. Dobijene vrednosti broja alela po pojedinačnim lokusima kod balkanskog magaraca su u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija na različitim populacijama magaraca. U istraživanju Jordana i sar. (2015) koje je obuhvatilo 350 jedinki iz 11 populacija južnoameričkih magaraca lokus sa najvećim brojem alela (13) bio je *AHT5*, dok su najmanje alela (4) imali lokusi *HTG6* i *HMS6*. Kod kineskih magaraca (Zhu i sar., 2013) najveću polimorfnost je ispoljio lokus *HMS2* sa 13 alela (64 jedinki), koji je i u uzorku balkanskog magarca imao veći broj alela, 8. Iako nije imao najmanje alela, lokus *HTG6* sa 6 alela je bio među manje polimorfnim zajedno sa lokusima *HMS6* i *HMS7*, koji su sa 4 alela ispoljili najmanju polimorfnost u ispitivanoj populaciji kineskih magaraca. Rase amiata i viterbeze su u studiji Matassino i sar. (2014) imali najmanje alela (4) na lokusu *HTG6* (135 jedinki), dok su među lokusima sa najvećim brojem alela bili *AHT4* (10) i *HTG7* (13), koji su i kod balkanskog magarca ispoljili veći broj alela, 11 odnosno 8. Na Siciliji je vršena genetička karakterizacija 108 jedinki tri rase, pantesko, ragusano i sivog sicilijanskog magarca (Bordonaro i sar., 2012), gde su lokusi sa najvećim brojem alela bili *AHT5* (10) i *HTG7* (11) za razliku od lokusa *HTG4* i *HTG6* koji su pokazali najmanje alela, 3 odnosno 5. U studiji Aranguren-Mendez i sar. (2001) kod 5 rasa španskih magaraca, (513 jedinki) gde su kao i kod

balkanskog magarca lokusi *AHT4* i *AHT5* pokazali veliki broj alela (15 i 14), dok je kod španskih magaraca i lokus *HTG6* pokazao veliki broj alela, 11.

Kada su u pitanju frekvence alela za pojedinačne ispitivane mikrosatelitske lokuse (Rezultati, Tabela 14), samo u pojedinim studijama su izneti podaci za određene markere. U studiji Rosenbom i sar. (2014) gde su ispitivali genetički diverzitet 129 magaraca iz oblasti severoistočne Afrike, Arapskog poluostrva i Bliskog istoka istaknute su frekvence alela za markere koji su imali veliki broj privatnih alela. U populaciji 60 magaraca severoistočne Afrike (Etiopija, Sudan i Egipt) na lokusu *AHT4* alel 6 (164bp) je pokazao najvišu frekvencu (0.230) kada se uporede sve analizirane jedinke. Sličan rezultat za lokus *AHT4* dobili su Matassino i sar. (2014) kod dve italijanske rase magaraca (135 jedinki), gde su dva alela, 6 (137 bp) i 10 (145 bp), pokazala najviše frekvence 0.5 i 0.3, dok su frekvence ostalih 12 alela bile niske. Kod balkanskog magarca za lokus *ATH4* alel 3 (148 bp) je ispoljio najvišu frekvencu od 0.230, dok su frekvence ostalih deset alela niske (0.007 - 0.197). Za razliku od rezultata iz studije Rosenbom i sar. (2014) gde je od uočenih 14 alela lokusa *AHT4* polovina alela pokazala značajno više frekvence nego preostali aleli, kod ispitivane populacije balkanskog magarca nije postojala jasna predominacija jednog alela, već su frekvence svih 11 alela niske sa relativno približnim vrednostima. Na lokusu *CA425* kod balkanskog magarca aleli 6 (234 bp) i 7 (236 bp) su pokazali najviše frekvence, (0.315) odnosno (0.247). Sličan rezultat je dobijen i kod magaraca iz oblasti koja predstavljaju tri hipotetička centra domestikacije magaraca (Rosenbom i sar., 2014) gde su dva (9 - 260 bp, 10 - 262 bp) od 11 alela pokazala znatno višu frekvencu (oko 0.4). Matassino i sar. (2014) su izvršili analizu 50 amiata i 85 viterbese magaraca korišćenjem 16 mikrosatelitskih markera. U navedenoj studiji, za lokus *HMS6* uočeno je 4 alela, gde su aleli 2 (152 bp) i 3 (154 bp) pokazali najvišu frekvencu od 0.5, odnosno 0.6. Od 8 alela koliko je nađeno za lokus *HMS6* kod balkanskog magarca, samo jedan alel je ispoljio znatno

višu frekvencu, i to alel 1 (152 bp) i ona je iznosila 0.455, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za isti alel kod viterbese magaraca (Matassino i sar., 2014). Frekvence alela za lokus *VHL20* kod italijanskih magaraca Matassino i sar. (2014) prate trend koji je dobijen na ovom lokusu kod balkanskog magarca, koji karakteriše dominacija jednog alela. Kod viterbese i amiata magaraca dominantni alel 3 čija je dužina 77 bp bio je prisutan sa učestanošću od oko 0.7, dok kod balkanskog magarca alel 3 (74 bp) je imao frekvencu od 0.532. Lokus *HTG10* je pokazao ravnomernu i nisku distribuciju 12 alela kod ispitivanih balkanskih magaraca, za razliku kod amiata i viterbese rasa gde su od 12 alela, dva alela imala značajno više frekvence, oko 0.4 (Matassino i sar., 2014). Upoređivanjem frekvenci alela uočenih kod balkanskog magarca sa u literaturi dostupnim podacima o učestalosti odgovarajućih alela na lokusima utvrđenim kod drugih rasa magaraca, može se uočiti različita distribucija frekvenci alela u okviru lokusa između balkanskog magarca i dve italijanske rase. Kod balkanskih magaraca ustanovljen je veći broj alela sa relativno niskim i ravnomerno raspoređenim frekvencijama. Nasuprot tome, kod amiata i viterbese rasa magaraca (Matassino i sar., 2014) ustanovljena je značajno visoka učestalost jednog alela.

Na osnovu dobijenih vrednosti osnovnih parametara genetičkog diverziteta i njihovim poređenjem sa rezultatima prethodnih studija na magarcima, možemo reći da rezultati ukazuju na visoku genetičku varijabilnost ispitivane populacije balkanskog magarca.

6.2.2 Parametri genetičke raznovrsnosti: dobijena i očekivana heterozigotnost

Na osnovu dobijenih vrednosti broja alela i njihovih frekvenci, za svaki ispitivan mikrosatelitski lokus određene su vrednosti parametara H_O i H_E za svaku

ispitivanu subpopulaciju (ZA, SP, KO) kao i za celu populaciju balkanskog magarca (Rezultati, Tabela 15). Kod sve tri populacije magaraca procenjene vrednosti za H_O i H_E za pojedinačne lokuse bile su generalno visoke i za ukupan broj jedinki iznosile u proseku $H_O = 0.798$ i $H_E = 0.763$. Kod 11 južnoameričkih populacija magaraca u studiji Jordana i sar. (2015) za 14 mikrosatelitskih markera ustanovljena je srednja vrednost dobijene heterozigotnosti koja je iznosila 0.512. Ako bi se analizirala svaka populacija iz navedene studije, najmanju vrednost dobijene heterozigotnosti imala je populacija magaraca iz Urugvaja (0.365) a najveću vrednost su pokazali magarci iz Brazila (0.601). Analizom 15 mikrosatelita kod populacija magaraca iz severoistočne Afrike, Bliskog istoka i Arapskog poluostrva, srednje vrednosti dobijene heterozigotnosti su iznosile 0.579, 0.564 i 0.613 (Rosenbom i sar., 2014). U navedenoj studiji, kod 25 magaraca iz Etiopije dobijena je najmanja vrednost dobijene heterozigotnosti od 0.464, a najveću vrednost (0.647) imala je populacija od 20 magaraca iz Sudana. Slične vrednosti H_O kod amiata i viterbese rasa dobili su Matassino i sar. (2014) koje su iznosile 0.578 odnosno 0.607, što je u saglasnosti sa prethodnom studijom na amiata rasi magaraca (Ciampolini i sar., 2007) gde je vrednost dobijene heterozigotnosti bila 0.579. Neznatno niže vrednosti dobijene heterozigotnosti (0.455) su zabeležene kod tri italijanske rase magaraca sa Sicilije (Bordonaro i sar., 2012). Izrazito nisku srednju vrednost H_O kod kineskih magaraca dobili su Zhu i sar. (2013) analizom 12 lokusa koja je iznosila 0.290. Među prvim studijama ovog tipa smatraju se istraživanja na katalonskom magarcu (Jordana i sar., 1999) i tri populacije hrvatskih magaraca (Ivanković i sar., 2002) gde je korišćen manji broj različitih mikrosatelita nego prethodno navede studije koje su bazirane na istim lokusim. Dobijene srednje vrednosti H_O u ovim studijama iznosile su 0.595 za katalonskog magarca i 0.632 za tri rase hrvatskih magaraca. Ako se sagledaju vrednosti dobijene heterozigotnosti prethodno analiziranih populacija magaraca, očigledno

je da je vrednost H_O od 0.798 za ispitivanu populaciju balkanskog magarca daleko veća i ukazuje na visoku genetičku raznovrsnost ove rase.

U ispitivanoj populaciji balkanskog magarca, ako se analiziraju vrednosti dobijene heterogenosti za svaki lokus, najvišu vrednost H_O od 0.998 ustanovljene su za marker *HTG10* sa 12 alela. Najniža vrednost H_O od 0.426 je utvrđena za marker *HTG6* kod koga je ustanovljeno 5 alela, koji sa lokusom *AHT5* (0.553) predstavlja dva lokusa sa najmanjim vrednostima H_O . Pored markera *HTG10*, još četiri markera su ispoljila visoke vrednosti za H_O i to: *ASB23* (0.967), *CA425* (0.974), *HMS3* (0.960) i *HTG7* (0.932). Kada su u pitanju vrednosti H_O za pojedinačne lokuse kod drugih rasa magaraca, moguće ih je uporediti sa studijama gde su autori omogućili dostupnost podataka. Najviše vrednosti H_O u populaciji magaraca sa Sicilije su pokazali lokusi *HTG10* (0.736), *HMS3* i *ASB23* (Bordonaro i sar., 2012), koji su u saglasnosti sa rezultatima kod balkanskog magarca. Slične vrednosti H_O kod amiata rase magaraca dobili su Ciampolini i sar. (2007) i Matassino i sar. (2014) za lokuse *ASB23* i *HMS3*, ali i za *HTG6* što nije slučaj kod balkanskog magarca. U studiji Aranguren-Mendez i sar. (2001) na 5 španskih rasa magaraca, među markerima sa najvećim vrednostima H_O su *HTG10*, *HTG7* kao i *HTG6* i *AHT5*, koji su kod balkanskih magaraca ispoljili najmanje vrednosti H_O . U prvoj studiji genotipizacije katalonskog magarca (Jordana i sar., 1999), jedan od 12 markera bio je i *HTG6* koji je ispoljio relativno visoke vrednosti $H_O=0.643$, koji su u saglasnosti sa kasnijim studijama španskih magaraca (Aranguren-Mendez i sar., 2001). Iako je vrednost H_O za lokus *HTG6* kod balkanskog magarca neznatno manja (0.426), ovaj marker je ispoljio najmanju dobijenu heterozigotnost u ispitivanom setu. Velika populacija ispitivanih južnoameričkih magaraca (Jordana i sar., 2015) pokazala je visoke vrednosti H_O za lokuse *HTG10*, *HTG7*, *AHT5*, dok je vrednost H_O za lokus *HTG6* bila približna H_O kod balkanskog magarca i iznosila je 0.573. U studiji Zhu i sar. (2013) kod jangjuang rase magaraca, vrednost dobijene

heterozigotnosti za marker *HTG6* bila je 0.464, dok je marker sa najmanjom vrednošću dobijene heterozigotnosti (0.038) bio *HTG7*.

Poređenjem vrednosti dobijene heterogenosti kod balkanskog magarca za svaki lokus, dobijeni su rezultati koji su u korelaciji sa rezultatima iz prethodnih poglavlja ove studije, a govore o visokoj varijabilnosti analiziranih lokusa.

6.2.3 Odstupanja učestalosti gena od Hardy-Weinberg očekivanja i neravnotežna vezanost parova lokusa

Za svih 11 analiziranih mikrosatelitskih lokusa je ustanovljeno da 4 lokusa (*AHT4*, *ASB23*, *HMS2* i *HTG7*) ne odstupaju od Hardy-Weinberg očekivanja, dok su preostalih 7 lokusa pokazali značajno odstupanje. Kada se analiziraju lokusi u svakoj populaciji posebno, ukupne prosečne vrednosti frekvence genotipova u populacijama ZA i KO značajno odstupaju od Hardy-Weinberg očekivanja. Uzroci ovakve devijacije od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže u ispitivanim populacijama balkanskog magarca mogu se delom objasniti analizom istorijskih događaja u nastajanju današnjih populacija balkanskog magarca. Naime, jedinke iz Zasavice i Kovilja predstavljaju populacije koje su relativno skoro formirane, u poslednjih 15-20 godina, od magaraca iz različitih izvornih populacija uglavnom poreklom sa više lokaliteta južne Srbije i Vojvodine. Na osnovu toga, višak homozigotnosti i značajna LD ("linkage disequilibrium") u 16 od 156 testova ukazuje na postojanje substrukture u ZA populaciji magaraca (odnosno Wahlund efekta) pre nego postojanja inbridinga među jedinkama što je potvrđeno u STRUCTURE analizi (detalnije u poglavlju 6.4 Genetička struktura populacije balkanskog magarca u Srbiji). Wahlund efekat predstavlja smanjenje heterozigotnosti određene populacije usled postojanja substrukture tj. više subpopulacija koje čine jednu populaciju a koje se odlikuju različitim frekvencama alela tako da se na nivou cele

populacije detektuje smanjenje ukupne heterozigotnosti, iako subpopulacije ne pokazuju odstupanja od Hardy-Weinberg očekivanja (Dharmarajan i sar., 2013). Nasuprot nalazu u ZA populaciji, kod magaraca u KO populaciji izražen je višak heterozigotnosti i značajna LD u 10 od 156 testova. Populacija magaraca KO je znatno manja od ZA populacije i formirana je od manjeg broja populacija tj. od manjeg broja prethodnih uzgajivača, što je verovatno uzrokovalo razlike u frekvenci alela kod muških i ženskih priplodnih grla (roditelja) usled binomne greške pri uzorkovanju (Pudovkin i sar., 1996). Navedena substrukuiranost populacije je zabeležena i kod drugih ispitivanih rasa magaraca (Aranguren-Mendez i sar., 2001).

U studiji Aranguren-Mendez i sar. (2001) u 5 populacija španskih magaraca, analizirano je odstupanje frekvenci gena od Hardy-Weinberg očekivanja za sve lokuse na celokupnom uzorku. Samo jedan lokus (*HMS5*) je bio u skladu sa očekivanjima prema Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži, i u 48 od 65 testova dobijeno je značajno odstupanje od Hardy-Weinberg očekivanja prikazujući značajan deficit heterozigotnosti, što, u odsustvu substrukture populacija i drugih faktora koji utiču na frekvence alela, može ukazivati na visok stepen inbreedinga i ispitivanim populacijama. Kineski jangjuan magarci, pokazali su visoku polimorfnost za 12 analiziranih lokusa i višak homozigotnosti, gde je samo jedan lokus (*HTG10*) bio u skladu sa očekivanjima prema Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži (Zhu i sar., 2013), što takođe može ukazivati na visok nivo inbreedinga u ispitivanim poulacijama. Međutim, autori su ovakav šablon objasnili postepenim smanjenjem broja magaraca, uticajem neprirodnih faktora selekcije i znatno manjim broj mužijaka u populaciji jangjuang magaraca.

U ispitivanim populacijama balkanskog magarca ustanovljeno je postojanje neravnotežne vezanosti kod tri para mikrosatelitskih lokusa i to između: *HMS6* i *ASB23*, *HMS6* i *HTG10*, *VHL20* i *HMS3* u ZA populaciji. Postoje različiti faktori

koji mogu uzrokovati detektovanje neravnoteže vezanosti gena čak i u slučajevima kada geni ne ispoljavaju pravu neravnotežu vezanosti, kao što je to slučaj sa lokusima koji su korišćeni u ovoj studiji. Na primer, usled rapidnog smanjenja brojnosti (usko grlo) u početnim fazama domestikacije vrste u celini i tokom procesa nastanka pojedinačnih rasa kao i osnivanja novih populacija (Groeneveld i sar., 2010), može se detektovati neravnoteža vezanosti gena koji ne pokazuju neravnotežu vezanosti u izvornim populacijama. Prema tome, kod većine današnjih rasa domaćih životinja i njihovih populacija mogla bi se očekivati neravnotežna vezanosti gena, što je i bio slučaj kod ZA populacije balkanskog magarca koja je pokazala heterogenu genetičku strukturu (videti podpoglavlje 6.3 Genetička struktura ispitivanih populacija balkanskog magarca) gde se od 3 genska pula, dva jasno izdvajaju.

S obzirom da ne postoje ranije studije na balkanskom magarcu koje su imale za cilj utvrđivanje genetičkog diverziteta na osnovu mikrosatelitskih markera, dobijeni rezultati predstavljaju važan rezultat koji ukazuje na postojanje visokog stepena genetičke varijabilnosti u ispitivanoj populaciji balkanskog magarca i odsustvo inbreedinga što je od izuzetne važnosti za konzervacione programe.

6.2.4 Parametri genetičkog diverziteta na osnovu analize varijabilnosti mtDNA

Na osnovu vrednosti parametara mtDNK raznovrsnosti (haplotipski diverzitet (0.849 ± 0.087) i nukleotidni diverzitet (0.01549 ± 0.008)) kod ispitivane rase balkanski magarac, može se zaključiti da se ona odlikuje visokim nivoom genetičke raznovrsnosti i na nivou mtDNK genoma. Prosečne vrednosti mtDNK diverziteta za ispitivane balkanske magarce su bile približno iste sa prosečnim vrednostima dobijenim kod 10 populacija balkanskih magaraca iz studije Perez-Pardal i sar. (2014), španskih (Aranguren-Mendez i sa., 2004) i italijanskih

(Pellecchia i sar., 2007) rasa magaraca, kineskih magaraca (Lei i sar., 2007; Chen i sar., 2010; Han i sar., 2014), domestifikovanih magaraca iz severoistočnih zemalja Afrike (Vila i sar., 2006; Kefena i sar., 2014) i magaraca iz klade 1 iz studije Kimura i sar. (2011).

Uprkos značajnoj depopulaciji balkanskih magaraca na teritoriji Srbije tokom proteklih decenija (Stanišić i sar., 2015a), dobijene visoke vrednosti genetičkog diverziteta na nuklearnom i mtDNK nivou, ukazuju da populacija magaraca u Srbiji nije značajnije zahvaćena gubitkom diverziteta i inbridingom.

6.3 Genetička struktura ispitivanih populacija balkanskog magarca

Vrednosti parametara genetičke diferencijacije populacija (F_{ST}) za mtDNK podatke bili su ispod nivoa statističke značajnosti dok je vrednost parametara F_{ST} za nuklearne podatke pokazala više, statistički značajne vrednosti (Rezultati, Tabela 19). Generalno, u ispitivanoj populaciji balkanskog magarca mali deo ukupnog diverziteta pripao je diverzitetu između ispitivanih subpopulacija magaraca za mtDNK i nuklearne podatke (Rezultati, Tabela 20, 21, AMOVA I). Međutim, za nuklearne podatke vrednost parametra F_{ST} između populacija bila je nešto veća i statistički značajna (Rezultati, Tabela 20). Ovi rezultati sugerišu da se tri ispitivane populacije balkanskog magarca poreklom iz Srbije genetički razlikuju na nivou nuklearne, ali ne i na nivou mitohondrijske DNK. Sličan rezultat su objavili Pérez-Pardal i sar. (2013) analizirajući 132 mtDNK sekvence poreklom od 10 populacija balkanskog magarca iz deset zemalja. U navedenom istraživanju korišćeno je samo 5 sekvenci balkanskog magarca poreklom iz Srbije, a nakon analize svih mtDNK sekvenci rezultati su pokazali slabo genetičko struktuiranje kod balkanskog magarca. Međutim, daljom analizom ispitivane populacije balkanskog magarca iz Srbije, koristeći Bajesovu klaster analizu (Bayesian

analysis) otkriven je šablon genetičkog struktuiranja, koji je mnogo kompleksniji, što je i opisano dalje u tekstu.

Na osnovu „model-based clustering“ (STRUCTURE analiza) optimalan broj genetičkih grupa (K) za ispitivanu populaciju balkanskog magarca bio je 2 (Rezultati, Grafikon 4). Za $K = 2$, jedinke sa visokim procentom članstva ($q_i > 0.8$) u zelenom genskom pulu pripadale su uglavnom ZA i SP populaciji, dok jedinke koje su pokazale pripadnost drugom, crvenom genskom pulu su bile prisutne i u ZA i SP populacijama, ali su ipak bile dominantne u KO populaciji (Rezultati, Slika 20). Dodatno, prilikom analize sa većim brojem genetičkih grupa ($K = 3-5$), po 16 jedinki u ZA i KO populaciji magaraca je pokazalo pripadnost zelenom odnosno crvenom genskom pulu, a dobijena pripadnost sa visokim procentom članstva ukazuje na njihov genetički integritet. Očuvanje pokazanog genetičkog integriteta među ispitivanim jedinkama rase balkanski magarac iz ZA i KO populacije se može objasniti direktnim parenjem fenotipski sličnih jedinki (Ivanković i sar., 2002). Prema podacima lokalnih odgajivača, menadžmenta SNR „Zasavica“ ali i prikupljenim fenotipskim podacima prilikom uzorkovanja materijala, jedinke koje pripadaju zelenom genskom pulu iz ZA populacije se razlikuju od ostalih opisanih i uzorkovanih „tradicionalnih“ balkanskih magaraca u pojedinim morfološkim osobinama kao što su veće vrednosti telesnih mera i boja dlačnog pokrivača. Navedene jedinke su identifikovane među odgajivačima kao do danas neokarakterisana rasa banatski magarac, čija depopulacija je više izražena nego kod ostalih populacija balkanskog magarca, s obzirom da do danas postoji samo nekoliko desetina magarca koji odgovaraju takvom fenotipskom opisu (Stanković, 2006). Ako se uzmu u obzir navodi lokalnih odgajivača o istorijskom postojanju populacije magaraca koja odgovara opisu banatskog magarca u području vojvođanske regije Banat, gde je parenje među fenotipski sličnim jedinkama bilo favorizovano, kao i činjenice da je ZA populacija formirana

dovodjenjem magaraca iz ove regije, može se reći da je dobijeni rezultati, odnosno, detektovanje zasebnog genskog fonda kojem pripadaju jedinke balkanskog magaraca iz ZA populacije, očekivan.

Jedinke koje su svrstane u crveni genski pul iz KO populacije imaju neznatno manje morfometrijske vrednosti nego jedinke iz zelenog genskog pula, i fenotipski odgovaraju opisu balkanskog magarca. Na osnovu podataka o uslovima držanja ove populacije magaraca tokom proteklih 15-20 godina, pri čemu se prevashodno misli na njihovu izolovanost na ostrvu Kovilj tokom prolećnog i letnjeg perioda, upliv genetičkog materijala iz drugih populacija tokom sezone parenja je ograničen. Pored navedenog, bitno je istaći da je ova populacija deficitarna u pogledu privatnih alela, što može biti rezultat osnivačkog efekta („founder effect“), uskog grla („bottleneck“) i/ili genetičkog drifta. Broj migranata po generaciji na nivou nuklearne DNK oslikava istorijski protok gena među ispitivanim populacijama, i između KO i SP populacije je bio relativno visok (18), dok je kod geografski bliskih populacija, KO i ZA, iznosio 7.

Kod magaraca iz SP populacije pri analizi tri genetičke grupe ($K = 3$) dominantne su bile jedinke koje su pripadale plavom genskom pulu, a iste su bile veoma zastupljene i u ZA populaciji. Dobijena zastupljenost jedinki koje pripadaju plavom genskom pulu odgovara zabeleženim podacima o istoriji formiranja ZA populacije, tj. o dovođenju magaraca iz oblasti Stare planine u SNR „Zasavica“. Individue iz SP koje pripadaju plavom genskom pulu takođe fenotipski odgovaraju opisu balkanskog magarca, te stoga ovaj rezultat ukazuje na heterogenost rase balkanski magarac u Srbiji. Opisana distribucija jedinki koje pripadaju zelenom, crvenom i plavom genskom pulu unutar i između ispitivanih populacija je rezultirala niskom ali statistički značajnom vrednošću parametara genetičke diferencijacije između parova ispitivanih populacija balkanskog magarca na nivou analiziranih mikrosatelitskih lokusa. Sa druge strane, magarci

koji su pripali plavom genskom pulu ($K = 3$), pokazali su hibridne genetičke profile na osnovu nuklearnih podataka pri analizi sa 4 i 5 genetičkih grupa ($K = 4 - 5$). Ovakav nalaz je u saglasnosti sa tradicionalnim načinom držanja populacija magaraca u Srbiji ali i na Balkanu, koje karakteriše česta migracija i uvođenje jedinki različitog geografskog porekla (Kugler i sar., 2008; Stanišić i sar., 2015a). S obzirom da jedinke iz plavog genskog pula imaju morfološke osobine tipične za rasu balkanski magarac, one mogu činiti drugu subpopulaciju rase balkanski magarac koja iz navedenog predstavlja veoma heterogenu rasu magaraca (Kugler i sar., 2008). Koristeći rezultate STRUCTURE analize, tj. svrstavanje jedinki u tri genska pula pri $K = 3$, formirane su tri grupe jedinki koje su imali visoku pripadnost ($q_i > 0.80$) zelenom genskom pulu (16 jedinki, „banatski magarac“), plavom genskom pulu (21 jedinka, prva subpopulacija balkanskog magarca) i crvenom genskom pulu (23 jedinke, druga subpopulacija balkanskog magarca), i izračunati su parametri genetičke diferencijacije između navedenih grupa. Dobijene su visoke i statistički značajne vrednosti F_{ST} između populacije banatskog magarca i obe subpopulacije ispitivanih balkanskih magaraca. Vrednost F_{ST} između banatskih magaraca i prve subpopulacije balkanskog magarca je iznosila 0.067 ($P = 0.000$), a između banatskih magaraca i druge subpopulacije balkanskog magarca je bila slična, 0.071 ($P = 0.000$). Vrednost F_{ST} između dve subpopulacije balkanskog magarca je bila duplo manja, 0.044 ($P = 0.000$). Vrednosti parametara genetičke diferencijacije između dobijenih genskih pulova su značajno veće od istih vrednosti prezentovanih u Tabeli 20. Rezultati iz ove studije dodatno podržavaju pretpostavku o prisutnosti fenotipski i genetički različitih rasa magaraca u Srbiji, balkanskog i banatskog magarca, kao i postojanje visoke genetičke heterogenosti rase balkanski magarac (Kugler i sar., 2008). Ivanković i sar. (2002) analizirajući do tada neokarakterisanu populaciju magaraca u Hrvatskoj koristeći sličnu metodologiju, definisali su tri različite rase magaraca,

primorsko-dinarsku, severno-jadransku i istarsku rasu magaraca. Na osnovu svih iznetih činjenica, postavlja se hipoteza da se slični rezultati mogu dobiti i u drugim zemljama Balkana, gde se mogu očekivati nove subpopulacije u okviru rase balkanski magarac.

6.4 Genetička struktura ispitivanih populacija balkanskog magarca dobijena analizom mtDNA

U cilju proširenja saznanja o genetičkoj strukturi ispitivane populacije balkanskih magaraca, dobijeni mtDNK podaci su analizirani zajedno sa 209 objavljenih mtDNK sekvenci izumrlih i današnjih rasa magaraca koji su poticali od 19 populacija sa evropskog i afričkog kontinenta. Vrednosti varijacije između analiziranih populacija u AMOVA I i AMOVA II analizama od 21.02% odnosno 27.97% (Tabela 21), ukazuju na moguće postojanje značajne genetičke struktuiranosti na nivou mtDNK kod populacija balkanskih magaraca, a koja u prethodnim istraživanjima nije uočena (Perez-Pardal i sar., 2013). Naime, u jedinom istraživanju koje je uključilo 10 populacija balkanskog magarca, Perez-Pardal i sar. (2013) su zaključili da kod analiziranih jedinki nedostaje genetička struktuiranost i da je diferenciranost balkanskih i afričkih magaraca koji su korišćeni kao filogenetski daleka grupa (outgroup) slaba. Haplotipovi balkanskih magaraca H13 (poreklom iz Albanije, Hrvatske, Makedonije, Grčke i Crne Gore) i H39 (poreklom iz Hrvatske) koji su bili identični sa arheološkim uzorcima somalijskih magaraca iz studije Kimura i sar. (2011). Jedan od mogućih razloga slabe struktuiranosti ispitivanih populacija balkanskih magaraca u studiji Perez-Pardal i sar. (2013) je relativno mali broj ispitivanih jedinki po svakoj ispitivanoj populaciji, koji kod navedenih zemalja nije bio veći od 18 a za populaciju Srbije je iznosio 5.

MDS analiza (Rezultati, Grafikon 2) je potvrdila jasnu divergenciju izumrlih somalijskih divljih magaraca (SWA). Prethodna istraživanja o poreklu današnjih rasa magaraca koja su koristila uzorke DNK pronađenih na arheološkim nalazištima na afričkom kontinentu (Beja-Pereira i sar., 2004; Rossel i sar., 2008; Kimura i sar., 2011; Han i sar., 2014) su takođe pokazala izdvajanje somalijskih divljih magaraca, kao i kada su iste jedinke upoređivane sa današnjim rasama etiopskih magaraca (Kefena i sar., 2014). Genetičke distance između 6 populacija etiopskih magaraca iz studije Kefena i sar. (2014) su potvrđene i MDS analizom. Etiopski *Sinnar* magarci su bili genetički najudaljeniji, dok je najmanja genetička udaljenost bila između *Afar* i *Hararghe*, kao i *Abyssinian* i *Omo* populacije magaraca. U MDS grafikonu, različite populacije balkanskih magaraca su ispoljile genetičke sličnosti sa različitim etiopskim populacijama, što govori u prilog velikom i očigledno heterogenom maternalnom nasleđu i kompleksnijom mtDNK strukturom nego što je pre opisivano (Perez-Pardal i sar., 2013). Kroz MDS grafikon uočena je i heterogenost dve populacije balkanskog magarca poreklom iz Srbije, tj. jedne populacije ispitivane u ovoj studiji i druge iz istraživanja Perez-Pardal i sar. (2013). Prva ispitivana populacija balkanskog magarca je grupisana sa izumrlim nubijskim divljim magarcima, etiopskim *Sinnar* magarcima, hrvatskim magarcima (Ivankovic i sar., 2002) i balkanskim magarcima poreklom iz Hrvatske i Grčke (Perez-Pardal i sar., 2013). Druga populacija balkanskih magaraca iz studija Perez-Pardal i sar. (2013) je grupisana sa većinom drugih populacija balkanskih magaraca iz iste studije (populacije iz Crne Gore, Bugarske, Albanije, Kosova, Makedonije i Ukrajine), kao i sa etiopskim populacijama *Afar* i *Hararghe*. Uprkos činjenici da dobijene odnose između srpskih populacija balkanskih magaraca treba uzeti sa rezervom usled mogućeg uticaja različitog načina uzorkovanja kao i činjenice da su u ovoj studiji korišćene nešto kraće sekvence HVR1 regiona u odnosu na drug studije što umanjuje rezoluciju, dobijeni rezultati

ističu važnost dizajna uzorkovanja u istraživanjima ovog tipa, ali i nagoveštavaju da postoji značajan drevni diverzitet nasleđivan po majčinskoj liniji u ispitivanoj populaciji balkanskog magarca poreklom iz Srbije.

6. 5 Poreklo i evolutivna istorija ispitivanih populacija balkanskog magarca

Prethodna molekularno-genetička istraživanja magaraca su isključila azijske linije divljih magaraca kao moguće progenitore (Beja-Pereira i sar., 2004; Han i sar., 2014). U ispitivanoj populaciji balkanskih magaraca sa tri odabrana lokaliteta, među 49 sekvenci HVR1 regiona mtDNK detektovano je 19 haplotipova. Haplotipovi balkanskih magaraca su analizirani sa sekvencama nubijskih i somalijskih divljih magaraca (Beja-Pereira i sar., 2004) koji su korišćeni za filogenetske analize putem konstrukcije NJ stabla u cilju utvrđivanja njihovih evolutivnih odnosa, kao i utvrđivanja pripadnosti prethodno prijavljenim kladama 1 i 2 današnjih rasa magaraca (Beja-Pereira i sar., 2004; Vila i sar., 2006; Kimura i sar., 2011; Han i sar., 2014). Dobijene su dve dobro podržane klade (Rezultati, Slika 21), gde je klada 1 obuhvatila jedan NWA haplotip i 9 haplotipova balkanskog magarca (h1 - h9), dok kladu 2 čine dve dobro podržane sub-klade. Prvu sub-kladu čine somalijski divlji magarci a drugu preostali divlji nubijski i balkanski magarci (h10 - h19). Beja-Pereira i sar. (2004) u opsežnom istraživanju sa 52 populacije izumrlih divljih i današnjih rasa magaraca poreklom iz Evrope, Azije i Afrike su objavili slične evolutivne odnose nubijskih i somalijskih divljih magaraca, pri čemu su ustanovili da su obe klade zastupljene širom sveta u približno jednakim proporcijama, sa neznatno većim procentom zastupljenosti haplotipova klade 1 u zapadnoj Africi u odnosu na druge regione Afrike. U studiji Han i sar. (2014), 21 uzorak DNK prikupljen sa 4 arheološka nalazišta koja datiraju od 500 - 20.000 godina pre n.e., dobijene su identične klade i odnosi nubijskih i

somalijskih divljih magaraca. Još značajnije, zastupljenost sekvenci mtDNK kineskih magaraca koje datiraju pre nove ere je jednaka u obe klade, sa jasnim odvajanjem somalijskih divljih magaraca u kladi 2, koji su formirali dobro podržanu sub-kladu. Slične rezultate kod 12 kineskih rasa magaraca dobili su i Lei i sar. (2007), gde su se jasno odvojile rase u dve klade, jednu sa "nubijskom" linijom, a drugu sa "somalijskom" linijom, pri čemu su somalijski divlji magarci jasno grupisani u zasebnu sub-kladu. Dobijena raspodela ispitivanih haplotipova mtDNK sekvenci balkanskih magaraca, koja je u saglasnosti sa obimnim studijama na kineskim rasama magaraca (Lei i sar., 2007; Chen i sar., 2010; Zhang i sar., 2010; Han i sar., 2014) ali i sa studijama na globalnom nivou (Beja-Pereira i sar., 2004), podržava tvrdnju da podela rasa magaraca na klade ne zavisi od veličine populacija ili geografskog porekla (Kimura i sar., 2013). Na osnovu do sada objavljenih podataka i dobijenih rezultata, nubijski divlji magarci mogu predstavljati pretke balkanskih magaraca iz klade 1 dok za balkanske magarce iz klade 2 i somalijske divlje magarce može postojati zajednički predak koji do danas nije poznat. Kao mogući preci za kladu 2 pominju se atlas divlji magarac, divlji magarci u Jemenu ili drugi do sada nepoznati izumrli afrički divlji magarci (Kimura i sar., 2013).

Filogeografska MJ (Median Joining) mreža (Slika 22) je konstruisana na osnovu 19 sekvenci mtDNK ispitivane populacije balkanskog magarca, kao i prethodno objavljenih mtDNK sekvenci (Ivanković i sar., 2001; Beja-Pereira i sar., 2004; Perez-Pardal i sar., 2013; Kefena i sar., 2014). Očekivano, haplotipovi su bili organizovani u 2 linije, što odgovara prethodno definisanim kladama 1 i 2 (Kimura i sar., 2011; Perez-Pardal i sar., 2013; Han i sar., 2014). Haplotipovi nađeni kod ispitivanih balkanskih magaraca bili su veoma divergentni i zastupljeni u skoro jednakom broju u obe klade (h1 - h9 u kladi 1, h10 - h19 u kladi 2) ali sa različitim frekvencijama. Osim toga, oni su zauzeli centralne i prve pericentralne

čvorove u obe klade. Pozicioniranje pojedinih haplotipova detektovanih kod balkanskog magarca u centralnim krugovima, međutim, treba uzeti sa rezervom jer su korišćene nešto kraće sekvence u odnosu na druge studije (tj. 423 bp nasuprot 479 bp korišćenih u istraživanju Perez-Pardal i sar., 2013). Upravo iz navedenih razloga nije moguće razlikovati određene haplotipove jasno razdvojene u prethodnim studijama pa su neki od njih predstavljeni unutar istog čvora (npr. h12, dva NWA haplotipa, H10, H13 i H47, kao i haplotipovi iz *Afar*, *Hararghe* i *Sinnar* populacije magaraca koji su predstavljeni zajednički u predačkom čvoru klade 2), ali su i neke geneološke veze između ispitivanih balkanskih magaraca i etiopskih haplotipova ostale nerazjašnjene. Devet haplotipova istraživanih balkanskih magaraca su jedinstveni i činili su centralne i pericentralne čvorove u obe klade, ali i tranzicione čvorove ka drugim izvedenim haplotipovima u kladi 1 (h2 i h7).

Poređenjem geografske distribucije geneološki povezanih haplotipova, uočeno je da je evolutivna istorija balkanskog magarca mnogo kompleksnija nego što je bilo uočeno u prethodnoj studiji (Perez-Pardal i sar., 2013). Veliki broj haplotipova klade 2 koji potiču od magaraca sa teritorije Balkana se razlikuje od ancestralnog haplotipa u 1 mutaciji. Uočeni šablon ukazuje na događaje drevne ekspanzije magaraca širom Balkana a odmah zatim i njihove lokalane diverzifikacije (Avisé, 2000). Ekspanzija magaraca sa afričkog na evropski kontinent se najverovatnije odvijala preko Grčke (Vila i sar., 2006), kao što je prikazano na MJ mreži u kojoj su grčki haplotipovi isključivo u čvorovima sa izumrlim divljim haplotipovima kao i u pojedinačnim srodničkim vezama sa somalijskim divljim afričkim magarcima. Prikazano pozicioniranje grčkih haplotipova sugerise da su magarci iz klade 2 bili prvi prisutni u Grčkoj, ali iz nekog razloga nisu uspeli da se prošire i diverzifikuju unutar Balkana pre magarca iz klade 1. Pojava sekvenci izumrlih nubijskih divljih magaraca u centralnom

čvoru klade 2 je neočekivano i navodi na pretpostavku da magarci iz klade 2 vode poreklo od nekog istorijskog nubijskog divljeg magarca, što je vrlo verovatno ako se uzme u obzir da je bila prisutna značajna maternalna genetička struktuiranost izumrlih populacija afričkih divljih magaraca pre procesa domestikacije (Beja-Pereira i sar., 2004; Marshall, 2007; Kimura i sar., 2011). Za izvođenje opštih zaključaka vezanih za ovaj aspekt evolutivne istorije magaraca, neophodna su dodatna, opširnija istraživanja. Sa druge strane, ograničena mtDNK diverzifikacija etiopskih haplotipova iz klade 2, je podržana i u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima Kefena i sar. (2014). U istraživanju mtDNK diverziteta i porekla 6 rasa etiopskih magaraca, Kefena i sar. (2014) su na osnovu MJ mreže izdvojili dve haplogrupe etiopskih magaraca, koje su udeljen 12 mutacija i odgovaraju grupisanju Beja-Pereira i sar. (2004) na dve klade. Haplogrupa 2 je pretežno sadržala haplotipove *Sinnar* magaraca sa slabo izraženom demografskom strukturom i istorijski delimičnom ekspanzijom, koji su i u ranijim analizama pokazali značajnu genetičku distancu (MDS analiza; Rezultati, Grafikon 2).

Mnogobrojni izvedeni haplotipovi klade 1 su organizovani u više pod-linija koje se radijalno šire iz centralnog čvora klade 1. Postojanje većeg broja pod-linija, svaka sa većim brojem haplotipova, ukazuje da je diverzifikacija ovih linija bila drevna, i da je ekspanzija ove klade na Balkanu prethodila ekspanziji klade 2. Prisutnost grčkih haplotipova u centralnom čvoru i u bazalnim čvorovima nekoliko pod-linija, ukazuje na to da se ekspanzija jedinki iz klade 1 na Balkanu, odvijala preko Grčke (Vila i sar., 2006). Genetički najudaljeniji haplotipovi u kladi 1 bili su W i Ws (koji pripadaju primorsko-dinarskim magarcima iz Hrvatske), koji su divergirali od hrvatskog Y haplotipa (iz klade 2) pre 1.05 - 2.11 miliona godina (Ivankovic i sar., 2002). Prema istraživanju Ivankovic i sar. (2002), W i Ws haplotipovi su slični haplotipovima objavljenim u studiji Ishida i sar. (1995) koji su

karakteristični za rase magaraca sa manjom veličinom tela. Etiopske populacije magaraca iz klade 1 su pokazale kompleksniju genetičku struktuiranost, što je u saglasnosti sa rezultatima Kefena i sar. (2014).

U istraživanjima vezanim za diverzitet i evolutivnu istoriju magaraca u kojima su korišćene mtDNK sekvence izumrlih i danas živućih rasa magaraca (Beja-Pereira i sar., 2004; Kimura i sar., 2011; Kefena i sar., 2014; Han i sar., 2014, trenutna studija), topologija MJ mreže pokazuje zanimljivu perspektivu na procese domestikacije. Uopšteno, topologija klade 1 kod magaraca je veoma slična topologiji haplogrupa dobijenim u istraživanjima procesa domestikacije evropskih i azijskih rasa svinja (Larson i sar., 2007), domaćih i divljih irvasa (Roed i sar., 2008), koje karakteriše postojanje nekoliko manjih čvorova i izmeđuost domaćih i divljih haplotipova u čvorovima. Navedena topologija predstavlja primer preživljavanja divljih populacija tokom procesa domestikacije i objašnjava minimalne razlike na mtDNK nivou između divljih i domestikovanih jedinki (Kimura i sar., 2011), pa je prihvaćena kao pojašnjenje domestikacionih procesa kod konja (Jansen i sar., 2002), psa (Savolainen i sar., 2002), svinje (Larson i sar., 2005) i irvasa (Roed i sar., 2008). Topologija klade 1 ukazuje na scenario domestikacije nubijskog divljeg magarca, koji uključuje nekoliko lokacija domestikacionih procesa i/ili veoma dug period trajanja domestikacionih procesa, sa uplivom različitih haplotipova divljih ili poludivljih magaraca, što je slično opisu domestikacionih događaja kod pasa (Vila i sar., 2001) i koza (Naderi i sar., 2008).

MtDNK haplotipovi balkanskih populacija magaraca iz Srbije su podeljeni u dve majčinske linije koje su prema Beja-Pereria i sar. (2004) klasifikovane kao klada 1 (h1-h9) i klada 2 (h10-h19), što je potvrđeno filogenetskim (NJ stablo; Rezultati, Slika 21) i filogeografskim (MJ mreža; Rezultati, Slika 22) analizama. Banatski magarci (16 jedinki iz ZA populacije koja pripada zelenom genskom

pulu) su skoro isključivo posedovali haplotip h12 i u MJ mreži grupisani u centralni (predački) čvor u kladi 2. Po jedna jedinka iz banatske populacije magaraca sa haplotipovima h2 i h3 je pripadala kladi 1. Geneološki odnosi haplotipova h2 i h3 impliciraju da su oni dobijeni kroz proces skorašnjeg protoka gena, introdukcijom ženki sa haplotipovima iz klade 1 i njihovim ukrštanjem sa mužijacima iz banatske populacije magaraca. Kao što je već navedeno, banatske magarce karakterišu veće vrednosti telesnih mera i različita boja dlake od preostalih ispitivanih magaraca iz Srbije. Slične fenotipske karakteristike su opisane i kod drugih populacija/jedinki čiji haplotipovi pripadaju kladi 2, kao što su hrvatski istarski i severno-jadranski magarci (Ivankovic i sar., 2002). Dobijeni rezultati bi mogli ukazati da veća telesna građa i različita boja dlačnog pokrivača karakteriše magarce iz klade 2 koji potiču sa teritorije Balkanskog poluostrva. Balkanski magarci iz KO populacije iz crvenog genskog pula, koje karakterišu nešto manje telesne mere sadržali su podjednaki broj haplotipova u kladi 1 i 2. Haplotipovi iz klade 2 pronađeni u ovim jedinkama najverovatnije su dobijeni introdukcijom u populaciju ženki sa haplotipovima iz klade 2, usled želje odgajivača da dobiju magarce sa jačom telesnom građom. Ovakvo objašnjenje je prihvaćeno i u istraživanju Ivankovic i sar. (2002) na hrvatskim magarcima, za prisustvo Y haplotipa u primorsko-dinarskim magarcima koji imaju manju telesnu građu. Jedinke koje su pripale drugoj subpopulaciji ispitivanih balkanskih magaraca (Rezultati, Slika 19, plavi genski fond, $K=3$) su okarakterisane visokim diverzitetom na nuklearnom nivou, dok analizom mtDNK sadrže skoro isključivo haplotipove iz klade 2. Ovo bi značilo da povećan diverzitet na nuklearnom DNK nivou može biti povezan sa prevalencom haplotipova iz klade 2 kod populacije balkanskih magaraca, a uočenu mtDNK strukturu su stekli parenjem sa jedinkama koje poseduju haplotipove iz klade 2. Na osnovu iznetih rezultata, za haplotipove

iz klade 1 se može reći da su tipični za rasu balkanski magarac, iako danas mali broj jedinki poseduje ove haplotipove.

Rezultati prve studije genetičke karakterizacije populacije balkanskog magarca poreklom iz Srbije su pokazali da ispitivane populacije nisu ozbiljno pogođene gubitkom genetičkog diverziteta niti ukrštanjem u srodstvu, uprkos znatnoj depopulaciji u proteklih nekoliko decenija (Stanišić i sar., 2015a). Odgoj populacija magaraca u Srbiji je uglavnom bio neplanski i bez adekvante evidencije (Stanišić i sar., 2015a). Ipak, postojalo je parenje između fenotipski sličnih jedinki, što je omogućilo favorizovanje postojećih osobina i opstanak neokarakterisanih populacija magaraca kao na pr. banatskog magarca. Populacije balkanskih magaraca su heterogene, i u Srbiji, jedinke sa zajedničkim fenotipskim odlikama, pokazale su različitost kako na nivou jedarne DNK tako i na nivou mtDNK, što potvrđuje zastupljenost haplotipova balkanskog magarca u obe klade. Dobijeni rezultati idu u prilog hipotezi koja bi definisala haplotipove iz klade 2 kao tipične za rase magaraca većeg rasta, dok u kladu 1 spadaju haplotipovi poreklom od rase magaraca manje i srednje konstitucije, kojoj pripada i balkanski magarac. Postojanje i/ili prevalenca haplotipova iz klade 2 kod ispitivanih magaraca, mogu se objasniti čestim uplivom ženki veće konstitucije koje pripadaju haplotipovima iz klade 2. Za razliku od prethodnih studija, rezultati analize mtDNK su ukazali na kompleksnu evolutivnu istoriju populacije balkanskog magarca koja potvrđuje teoriju (Vilá i sar., 2006) introdukcije magaraca na Balkansko poluostrvo preko Grčke.

7. Zaključci

Na osnovu rezultata prve studije fenotipske i genetičke karakterizacije rase balkanski magarac, zasnovane na utvrđivanju morfometrijskih, hematoloških i biohemijskih parametara kao i analizi polimorfizma autozomalnih mikrosatelitskih i mitohondrijskih (HVR1) markera, izvedeni su sledeći najvažniji zaključci:

1. Na osnovu normalne distribucije vrednosti morfoloških parametara ispitivanih jedinki, kao i statistički značajne razlike u vrednostima morfoloških parametara u odnosu na upoređene rase magaraca, ustanovljene vrednosti telesnih mera za balkanskog magarca mogu se koristiti kao referentne.
2. Vrednosti hematoloških i biohemijskih parametara krvi kao i pokazana korelacija navedenih parametara sa odgovarajućim starosnim grupama u ispitivanoj populaciji balkanskog magarca odgovaraju vrednostima ustanovljenim u prethodnim istraživanjima sprovedenim na magarcima.
3. Komercijalni panel mikrosatelita namenjen genotipizaciji konja omogućava pouzdanu genotipizaciju i individualnu identifikaciju jedinki rase balkanski magarac.
4. Na nivou tri ispitivane populacije rase balkanski magarac u Srbiji, odstupanja frekvenci gena od Hardy-Weinberg očekivanja i statistički značajan suficit homozigota uočavaju se samo kod populacije u Zasavici, što je posledica substrukture populacije odnosno Wahlund efekta.
5. Utvrđeno je da u ukupnom uzorku postoje dva genofonda od kojih prvi predstavlja heterogenu rasu balkanski magarac i obuhvata dve subpopulacije, a drugi obuhvata određen broj jedinki u populaciji u Zasavici i jasno se razlikuje od rase balkanski magarac. Uzimajući u obzir i

fenotipske osobine jedinki drugog genofonda, pretpostavka je da ove jedinke pripadaju do danas neokarakterisanoj rasi banatski magarac.

6. Rezultati prve studije genetičke karakterizacije populacije balkanskog magarca poreklom iz Srbije primenom jedarnih mikrosatelita pokazali su da ispitivane populacije nisu ozbiljno pogođene gubitkom genetičkog diverziteta niti ukrštanjem u srodstvu, uprkos znatnoj depopulaciji u proteklih nekoliko decenija.
7. Ispitivane populacije rase balkanski magarac iz Srbije odlikuju se visokim nivoom genetičke raznovrsnosti i na nivou mitohondrijskog genoma.
8. Filogenetska analiza na nivou mtDNK je pokazala heterogenost mitohondrijskih haplotipova detektovanih kod jedinki ispitivane rase balkanski magarac, koji su organizovani u dve sestrinske klade, 1 i 2.
9. Filogeografskom analizom utvrđena je prisutnost grčkih haplotipova u centralnom čvoru i u bazalnim čvorovima nekoliko pod-linija detektovanih u okviru i klade 1 i klade 2, što ukazuje i potvrđuje teoriju da se ekspanzija magaraca na Balkansko poluostrvo odvijala preko Grčke.
10. Magaraci za koje su karakteristični haplotipovi klade 1 ranije su stigli na Balkansko poluostrvo, ali je njihova dalja ekspanzija bila ograničena. Magaraci koji pripadaju kladi 2 dospeli su na Balkan nakon magaraca iz klade 1 i imali su uspešnu ekspanziju i diversifikaciju u ovom regionu.

8. Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je deo projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, ev. br. III46002 pod nazivom „Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane”, pod rukovodstvom prof. dr Zorana Stanimirovića.

9. Literatura

1. Abdul-Muneer P. M. (2014) Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics research international*, 2014.
2. Aberle K. S., Hamann H., Drögemüller C., Distl O. (2004) Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. *Animal genetics*, 35(4), 270-277.
3. Alberghina D., Fazio F., Arfuso F., Scianò S., Zumbo A., Piccione G. (2013) Reference intervals of serum protein concentrations from clinically healthy female Ragusana donkeys (*Equus asinus*) determined by cellulose acetate electrophoresis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33 (6), 433-436.
4. Albrechtsen A., Nielsen F. C., Nielsen R. (2010) Ascertainment biases in SNP chips affect measures of population divergence. *Molecular biology and evolution*, msq148.
5. Aranguren-Mendez J., Beja-Pereira A., Avellanet R., Dzama K., Jordana J. (2004) Mitochondrial DNA variation and genetic relationships in Spanish donkey breeds (*Equus asinus*). *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121, 319-30.
6. Aranguren-Mendez J., Jordana J., Gomez M. (2001) Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics Selection Evolution* 33, 433-42.
7. Ashton G. C. (1958) Serum protein variation in horses. *Nature* 182, 1029-1030.

8. Avise J.C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, US and London, UK.
9. Bandelt H.J., Forster P. & Rohlf A. (1999) A Median-joining network for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48.
10. Barker J. S. F. (1999) Conservation of livestock breeds diversity. *Animal Genetic Resources Information*, 25, 33-43.
11. Beja-Pereira A., England P.R., Ferrand N., Jordan S., Bakhiet A.O., et al. (2004) African origins of the domestic donkey. *Science* 304, 1781-1781.
12. Bellone R. R., Cothran E. G. & Ketchum M. S. (1998) Genetic variation in the rare donkey breed, Baudet du Poitou. *Animal Genetics* 29, no. Suppl 1: 17.
13. Bensasson D., Zhang D. X., Hartl D. L., Hewitt G. M. (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in ecology & evolution*, 16 (6), 314-321.
14. Beretti V., Zanon A., Soffiantini C.S., Sabbioni A. (2005) Preliminary results about morphological and demographic traits of Romagnolo donkey. *Annali della Facolta` di Medicina Veterinaria di Parma* 25, 131-44.
15. Berthouly C., Leroy G., Van T. N., Thanh H. H., Bed'Hom B., Nguyen B. T., Maillard J. C. (2009) Genetic analysis of local Vietnamese chickens provides evidence of gene flow from wild to domestic populations. *BMC genetics*, 10(1), 1.
16. Bertolini F., Scimone C., Geraci C., Schiavo G., Utzeri V. J., Chiofalo V., Fontanesi L. (2015) Next generation semiconductor based sequencing of the donkey (*Equus asinus*) genome provided comparative sequence data against the horse genome and a few millions of single nucleotide polymorphisms. *PLoS one*, 10 (7), e0131925.

17. Bigi D., Zambonelli P., Perrotta G., Blasi M. (2007) The Ventasso Horse: genetic characterization by microsatellites markers. *Italian Journal of Animal Science*, 6(sup1), 50-52.
18. Bjørnstad G., Nilsen N. Ø., Røed K. H. (2003) Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horses?. *Animal Genetics*, 34(1), 55-58.
19. Blasi M., Perrotta G., Lanza A., Iamartino D., Pilla F. (2005) Genetic diversity in three Italian donkey populations assessed by microsatellite markers. *Italian Journal of Animal Science*, 4, 127-127.
20. Blench R. M. (2000) A history of donkeys, wild asses and mules in Africa. In Blench R. M., MacDonald K. C. (Eds.) *The origins and development of African livestock: Archaeology, genetics, linguistics and ethnography* (pp. 339-354). London: UCL.
21. Boesneck J., von den Driesch A. (1990) Tierreste aus der vorgeschichtlichen Siedlung von El-Omari bei Heluan/UnterÄgypten. In F. Debono & B. Mortensen (Eds.), *El Omari* (pp. 99-107). Mainz: von Zabern.
22. Boesneck J., von den Driesch A., Ziegler R. (1989) Die Tierreste von Maadi und Wadi Digla. In I. Rizkana & J. Seeber (Eds.), *Maadi III* (pp. 87-128). Mainz: von Zabern.
23. Bökönyi S. (1985) The animal remains of Maadi, Egypt: A preliminary report. In M. Liverani, A. Palmieri, & R. Peroni (Eds.), *Studi di paleontologia in onore do Salvatore M. Puglisi* (pp. 495-499). Rome: Università di Roma 'La Sapienza'.
24. Bordonaro S., Guastella A. M., Criscione A., Zuccaro A., & Marletta D. (2012) Genetic diversity and variability in endangered Pantesco and two other Sicilian donkey breeds assessed by microsatellite markers. *The Scientific World Journal* doi:10.1100/2012/648427.

25. Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32 (3), 314.
26. Bovine HapMap Consortium. (2009) Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science*, 324(5926), 528-532.
27. Bradley D. G., Magee D. A. (2006) Genetics and the origins of domestic cattle. *Documenting domestication: new genetic and archaeological paradigms*, 317-328.
28. Braend M. (1964) Serum types of Norwegian horses. *Nordisk Veterinaer Medicin*, 16, 363-373.
29. Braend M., Efremov G. (1965) Haemoglobins, haptoglobins and albumins of horses. In *Blood Groups of Animals* (pp. 253-259). Springer Netherlands.
30. Brandström M., Ellegren H. (2008) Genome-wide analysis of microsatellite polymorphism in chicken circumventing the ascertainment bias. *Genome research*, 18 (6), 881-887.
31. Brown W. M., Prager E. M., Wang A., Wilson A. C. (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18(4), 225-239.
32. Bruford M. W., Bradley D. G., Luikart G. (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, 4 (11), 900-910.
33. Budwole B., Garofano P., Hellman A., Ketchum M., Kanthaswamy S., Parson W., van Haeringen W., Fain S. & Broad T. (2005) Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal of Legal medicine* 119, 295-302.
34. Caldin M., Furlanello T., Solano-Gallego L., De Lorenzi D., Carli E., Tasca S., Lubas G. (2005) Reference ranges for haematology, biochemical profile and

- electrophoresis in a single herd of Ragusana donkeys from Sicily (Italy). *Comparative Clinical Pathology*, 14 (1), 5-12.
35. Canon J., Checa M. L., Carleos C., Vega-Pla J. L., Vallejo M., Dunner S. (2000) The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal genetics*, 31(1), 39-48.
36. Canon J., García D., García-Atance M. A., Obexer-Ruff G., Lenstra J. A., Ajmone-Marsan P., Dunner S. (2006) Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East. *Animal Genetics*, 37, 327-334.
37. Cattani M., Bökönyi S. (2002) Ash-Shumah: An early Holocene settlement of desert hunters and mangrove foragers in the Yemeni Tihamah'. In S. Cleuziou, M. Tosi, & J. Zarins (Eds.), *Essays of the late prehistory of the Arabian Peninsula* (pp. 31-53). Rome: Istituto Italiano per l'Africa e l'Oriente.
38. Cecchi F., Ciampolini R., Ciani E., Matteoli B., Mazzanti E., Tancredi M., Presciuttini S. (2006) Demographic genetics of the endangered Amiata donkey breed. *Italian Journal of Animal Science*, 5, 387-391.
39. Chen J., Yujiang S., Dugarjaviin M., Lingjiang M. & Qingjie P. (2010) Maternal genetic diversity and population structure of four Chinese donkey breeds. *Livestock Science* 131, 272-80.
40. Chen S. Y., Zhou F., Xiao H., Sha T., Wu S. F., Zhang Y. P. (2006) Mitochondrial DNA diversity and population structure of four Chinese donkey breeds. *Animal Genetics*, 37, 427-429.
41. Chikhi L., Goossens B., Treanor A., Bruford M. W. (2004) Population genetic structure of and inbreeding in an insular cattle breed, the Jersey, and its implications for genetic resource management. *Heredity*, 92, 396-401.
42. Chowdhary B. P., Raudsepp T. (2000) Cytogenetics and physical gene maps. *The genetics of the horse*, 171-242.

43. Ciampolini R., Cecchi F., Mazzanti E., Ciani E., Tancredi M. & De Sanctis B. (2010) The genetic variability analysis of the Amiata donkey breed by molecular data." *Italian Journal of Animal Science* 6, 78-80.
44. Ćinkulov M., Popovski Z., Porcu K., Tanaskovska B., Hodžić A., Bytyqi H., Trailović, R. (2008) Genetic diversity and structure of the West Balkan Pramenka sheep types as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Journal of animal breeding and genetics*, 125(6), 417-426.
45. Clutton-Brock J. (1992) *Horse power: a history of the horse and the donkey in human societies*. Natural History Museum Publications.
46. Collard B. C. Y., Jahufer M. Z. Z., Brouwer J. B., Pang E. C. K. (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142 (1-2), 169-196.
47. Colli L., Perrotta G., Negrini R., Bomba L., Bigi D., Zambonelli P., Ajmone-Marsan P. (2013) Detecting population structure and recent demographic history in endangered livestock breeds: the case of the Italian autochthonous donkeys. *Animal Genetics*, 44, 69-78.
48. Cowan C.W., Watson P.J. (1992) *The origin of agriculture. An international perspective. Some concluding remarks*. Smithsonian Institution, 207-212.
49. Crespillo M., Paredes M. R., Prieto L., Montesino M., Salas A., Albarran C., Carril J. C. (2006) Results of the 2003–2004 GEP-ISFG collaborative study on mitochondrial DNA: focus on the mtDNA profile of a mixed semen-saliva stain. *Forensic Science International*, 160 (2), 157-167.
50. Cymbron T., Freeman A. R., Malheiro M. I., Vigne J. D., Bradley D. G. (2005) Microsatellite diversity suggests different histories for Mediterranean and Northern European cattle populations. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272(1574), 1837-1843.

51. D'Alessandro, A. G., Martemucci, G. (2012) Lactation curve and effects of milking regimen on milk yield and quality, and udder health in Martina Franca jennies. *Journal of Animal Science*, 90(2), 669-681.
52. Dahl G., Hjort A. (1976) Having herds: pastoral herd growth and household economy. Department of Social Anthropology, University of Stockholm.
53. Davidovic S., Malyarchuk B., Aleksic J. M., Derenko M., Topalovic V., Litvinov A., Kovacevic-Grujicic N. (2015) Mitochondrial DNA perspective of Serbian genetic diversity. *American journal of physical anthropology*, 156, 449-465.
54. de Oliveira F. R. A. P., Gacek F., Leao J. D. S., Vieira J. M., Augusto C. (1983) Profile of globulins in the serum of pregnant donkeys. *Boletim de Industria Animal (Brazil)*.
55. Destro-Bisol G., Jobling M. A., Rocha J., Novembre J., Richards M. B., Mulligan C., Manni F. (2010) Molecular anthropology in the genomic era. *Journal of Anthropology and Science*, 88, 93-112.
56. Dharmarajan G., Beatty W. S., Rhodes O. E. (2013) Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund effect: dispelling unfounded expectations. *The Journal of Wildlife Management*, 77(2), 226-234.
57. Di Meo G. P., Perucatti A., Peretti V., Incarnato D., Ciotola F., Liotta L., Iannuzzi L. (2009) The 450-band resolution G-and R-banded standard karyotype of the donkey (*Equus asinus*, $2n= 62$). *Cytogenetic and genome research*, 125(4), 266-271.
58. Diamond, J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418, 700-707
59. Dimsoski, P. (2003) Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. *Croatian Medical Journal* 44, 332-35.

60. Doan R., Cohen N., Harrington J., Veazy K., Juras R., Cothran G., Dindot S. V. (2012) Identification of copy number variants in horses. *Genome research*, 22(5), 899-907.
61. Dugat S. L., Taylor T. S., Matthews N. S., Gold J. R. (2010) Values for triglycerides, insulin, cortisol, and ACTH in a herd of normal donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, 30(3), 141-144.
62. Edgar R.C. (2004) MuSCle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792-97.
63. Ellegren H. (2000). Microsatellite mutations in the germline:: implications for evolutionary inference. *Trends in genetics*, 16(12), 551-558.
64. Ellegren H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, 5(6), 435-445.
65. Ellegren H. (2008) Characteristics, causes and evolutionary consequences of male-biased mutation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1606), 1-10.
66. Epstein H. (1971) *The Origin of Domestic Animals of Africa*. Africana Publication Corporation, New York, p. 719.
67. Equine Genetics and Parentage Analysis Workshop (2012) *Equine Genetics & Thoroughbred Parentage Testing Standardisation Workshop*. <http://www.isag.us/Docs/EquineGenParentage2012.pdf>: 1-14.
68. Etana K. M., Jenbere T. S., Bojia E., Negussie H. (2011) Determination of reference hematological and serum-biochemical values for working donkeys of Ethiopia. *Veterinary Research*, 4(3), 90-94.
69. Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620.

70. Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2006). Arlequin ver 3.1 user manual. Available at: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>
71. FAO (2011) Molecular-genetic characterization of animal genetic resources. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
72. FAO (2013) Food systems for better nutrition. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
73. FAO (2015) The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by B.D. Scherf & D. Pilling. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome (available at <http://www.fao.org/3/a-i4787e/index.html>)
74. Fermaglich D., Horohov D. (2002) The effect of aging on immune responses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 18, 621–630.
75. Fernández-Silva P., Enriquez J. A., Montoya J. (2003) Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental physiology*, 88(1), 41-56.
76. Fielding D., Starkey P. (2004) Donkeys, people and development. A resource book of the Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA).
77. Folch P, Jordana J: Characterization, reference ranges and the influence of gender on morphological parameters of the endangered Catalanian donkey breed. *Journal of Equine Veterinary Science* 1997, 17:102-111.
78. Folch P., Jordana J., Cuenca R. (1997) Reference ranges and the influence of age and sex on haematological values of the endangered Catalanian donkey. *The Veterinary Journal*, 154(2), 163-168.
79. Fornal A., Radko A., Piestrzyńska-Kajtoch A. (2013) Genetic polymorphism of Hucul horse population based on 17 microsatellite loci. *Acta Biochimica Polonica* 60, 761-65.

80. Fowler ME, Zinkl JG: Reference ranges for hematologic and serum biochemical values in llamas (*Lama glama*). *Am J Vet Res* 1989, 50:2049-2053.
81. Freeman, A. R., Hoggart, C. J., Hanotte, O., & Bradley, D. G. (2006). Assessing the relative ages of admixture in the bovine hybrid zones of Africa and the Near East using X chromosome haplotype mosaicism. *Genetics*, 173, 1503–1510.
82. French J. M., Patrick V. H. (1995) Reference values for physiological, haematological and biochemical parameters in domestic donkeys (*Equus asinus*). *Equine Veterinary Education*, 7(1), 33-35.
83. Gahne B. (1966). Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterases of horses. *Genetics*, 53(4), 681.
84. Galtier N., Nabholz B., Glémin S., Hurst G. D. D. (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22), 4541-4550.
85. Gebrewold A., Tegenge A., Yami A. (2004) Research need of donkey utilization in Africa. In: Fielding D., Starkey P. (Eds.), *Donkeys, people and development. A resource book of the Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA)*. Technical Center for Agricultural and Rural Cooperation (CTA), Wageningen, The Netherlands, pp. 77–81.
86. George M.J., Ryder O.A. (1986) Mitochondrial DNA evolution in the genus *Equus*. *Mol Biol Evol* 3(6), 535–546.
87. Georgescu S. E., Manea M. A., Dudu A., Costache, M. (2012) Phylogenetic relationships of the Mangalitsa swine breed inferred from mitochondrial DNA variation. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8467-8481.

88. Gingerich P. D. (2006) Environment and evolution through the Paleocene-Eocene thermal maximum. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(5), 246-253.
89. Girardi A. M., Marques L. C., de Toledo C. Z. P., Barbosa J. C., Maldonado Jr W., Jorge R. L. N., da Silva Nogueira C. A. (2014) Biochemical profile of the Pêga donkey (*Equus asinus*) breed: influence of age and sex. *Comparative Clinical Pathology*, 23(4), 941-947.
90. Gissi C., Iannelli F., Pesole G. (2008) Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101(4), 301-320.
91. Giuffra E. J. M. H., Kijas J. M. H., Amarger V., Carlborg Ö., Jeon J. T., Andersson L. (2000) The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, 154(4), 1785-1791.
92. Gizaw S., Van Arendonk J. A., Komen H., Windig J. J., Hanotte O. (2007) Population structure, genetic variation and morphological diversity in indigenous sheep of Ethiopia. *Animal Genetics*, 38(6), 621-628.
93. Glowatzki-Mullis M. L., Muntwyler J., Bäumle E., Gaillard C. (2008). Genetic diversity measures of Swiss goat breeds as decision-making support for conservation policy. *Small Ruminant Research*, 74(1), 202-211.
94. Groenen M. A., Archibald A. L., Uenishi H., Tuggle C. K., Takeuchi Y., Rothschild M. F., Li S. (2012) Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, 491(7424), 393-398.
95. Groeneveld L. F., Lenstra J. A., Eding H., Toro M. A., Scherf B., Pilling D. et al. (2010) Genetic diversity in farm animals—a review. *Animal Genetics*, 41(s1), 6-31.
96. Groves, C. P. (1986). The taxonomy, distribution, and adaptation of recent equids. In R. H. Meadow & H.- P. Uerpmann (Eds.), *Equids in the ancient world* (pp. 11–65). Wiesbaden: Ludwig Reichert Verlag.

97. Guastella A. M., Zuccaro A., Bordonaro S., Criscione A., Marletta D., D'Urso G. (2007) Genetic diversity and relationship among the three autochthonous Sicilian donkey populations assessed by microsatellite markers. *Italian Journal of Animal Science*, 6(sup1), 143-143.
98. Guo S. W., Thompson E. A. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-72.
99. Hammer Ø., Harper D. & Ryan P.D. (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9.
100. Han L., Zhu S., Chao N., Cai D., Wang K. et al. (2014) Ancient DNA provides new insight into the maternal lineages and domestication of Chinese donkeys. *BMC Evolutionary Biology* 14, 246.
101. Hanotte O., Bradley D. G., Ochieng J. W., Verjee Y., Hill E. W., Rege J. E. O. (2002) African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science*, 296 (5566), 336-339.
102. Helyar S. J., Hemmer-Hansen J., Bekkevold D., Taylor M. I., Ogden R., Limborg M. T., Nielsen E. E. (2011) Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources*, 11(s1), 123-136.
103. Henry M. R. J. M., Gastal E. L., Pinheir L. E. L., Guimaraes S. E. F. (1995) Mating pattern and chromosome analysis of a mule and her offspring. *Society for the Study of Reproduction*.
104. Hey J., Machado C. A. (2003) The study of structured populations—new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics*, 4(7), 535-543.
105. Hiendleder S., Kaupe B., Wassmuth R., Janke A. (2002) Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides

- evidence for domestication from two different subspecies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269(1494), 893-904.
106. Holm S. (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6, 65-75.
107. Huang J., Zhao Y., Bai D., Shiraigol W., Li B., Yang L., Zhao Q. (2015) Donkey genome and insight into the imprinting of fast karyotype evolution. *Scientific reports*, 5.
108. Hubby J. L., Lewontin R. C. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54(2), 577.
109. Ishida N., Oyunsuren T., Mashima S., Mukoyama H., Saitou N. (1995) Mitochondrial DNA sequences of various species of the genus *Equus* with special reference to the phylogenetic relationship between Przewalskii's Wild Horse and domestic horse. *Journal of Molecular Evolution* 41, 180-88.
110. Ivankovic A, Caput P, Mioc B, Pavic V: The phenotype Features of Donkeys in Croatia. *ACS* 2000, 65:99-105.
111. Ivankovic A, Kavar T, Caput P, Mioc B, Pavic V, Dovc P (2002) Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian coastal region. *Animal Genetics*, 33:169-177.
112. Ivanković A., Caput P. (1999) Genetski polimorfizmi proteina krvi magaraca u Hrvatskoj. *Stočarstvo* 53:91-100
113. Ivanković A., Caput P. (2000) Genetic polymorphism of transferrin and albumin in donkeys in Croatia. *Czech Journal of Animal Science* 45, 49-52.
114. Ivanković A., Caput P., Ernoic M. (1998) Donkeys in Croatia. In: OMMI, Neszmélyi Károly (eds) *Proceedings of International Conference on Conservation of Endangered Autochthonous Animal Breeds of Danubian Countries*, Budapest, Hungary, pp 46-51.

115. Jansen T., Forster P., Levine M. A., Oelke H., Hurler M., Renfrew C., Olek K. (2002) Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10905-10910.
116. Javier Azor P., Valera M., Gómez M. D., Goyache, F., Molina A. (2007) Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 30(1), 37-42.
117. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316:76-79
118. Jones N., Ougham H., Thomas H. (1997) Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist*, 137(1), 165-177.
119. Jordana J., Ferrando A., Miró J., Goyache F., Loarca A. et al. (2016) Genetic relationships among American donkey populations: insights into the process of colonization. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133, 155-64.
120. Jordana J., Folch P. & Sanchezm A. (1999) Genetic variation (protein markers and microsatellites) in endangered Catalanian donkeys. *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 791-98.
121. Jordana J., Folch P. (1996) The endangered Catalanian donkey breed: the main ancestor of the American ass or Mammoth. *Journal of Equine Veterinary Science*, 16, 436-441.
122. Jordana J., Folch P., Cuenca R. (1998) Clinical biochemical parameters of the endangered Catalanian donkey breed: normal values and the influence of sex, age, and management practices effect. *Research in veterinary science*, 64(1), 7-10.
123. Kakoi H., Tozaki T., Gawahara H. (2007) Molecular analysis using mitochondrial DNA and microsatellites to infer the formation process of Japanese native horse populations. *Biochemical genetics*, 45(3-4), 375-395.

124. Kaminski M., Gajos E. (1964) Comparative examination of carboxylic esterases in sera of horse, donkey and their hybrids. *Nature*, 201(4920), 716-718.
125. Kaneko J. J., Harvey J. W., Bruss M. L. (Eds.). (2008) *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press.
126. Kantanen J., Edwards C. J., Bradley D. G., Viinalass H., Thessler S., Ivanova Z., Ammosov I. (2009) Maternal and paternal genealogy of Eurasian taurine cattle (*Bos taurus*). *Heredity*, 103, 404-415.
127. Kasamatsu H., Robberson D. L., Vinograd J. (1971) A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(9), 2252-2257.
128. Kavar T., Brem G., Habe F., Solkner J., Dovc P. (2002) History of Lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis. *Genetics Selection Evolution*, 34(5), 635.
129. Kavar T., Dovč P. (2008) Domestication of the horse: Genetic relationships between domestic and wild horses. *Livestock Science*, 116(1), 1-14.
130. Kefena E., Beja-Pereira A., Han J. L., Haile A., Mohammed Y. K., Dessie T. (2011) Eco-geographical structuring and morphological diversities in Ethiopian donkey populations. *Livestock Science*, 141(2), 232-241.
131. Kefena E., Dessie T., Tegegne A., Beja-Pereira A., Yusuf Kurtu M. et al. (2014) Genetic diversity and matrilineal genetic signature of native Ethiopian donkeys (*Equus asinus*) inferred from mitochondrial DNA sequence polymorphism. *Livestock Science* 167, 73-79.
132. Kelkar Y. D., Strubczewski N., Hile S. E., Chiaromonte F., Eckert K. A., Makova K. D. (2010) What is a microsatellite: a computational and

- experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. *Genome biology and evolution*, 2, 620-635.
133. Kelkar Y. D., Tyekucheva S., Chiaromonte F., Makova K. D. (2008) The genome-wide determinants of human and chimpanzee microsatellite evolution. *Genome research*, 18(1), 30-38.
134. Kerem B. S., Rommens J. M., Buchanan J. A., Markiewicz D., Cox T. K. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245(4922), 1073.
135. Keyser-Tracqui C., Blandin-Frappin P., Francfort H. P., Ricaut F. X., Lepetz S., Crubézy E., Ludes B. (2005) Mitochondrial DNA analysis of horses recovered from a frozen tomb (Berel site, Kazakhstan, 3rd Century BC). *Animal Genetics*, 36(3), 203-209.
136. Kimura B., Marshall F., Beja-Pereira A., Mulligan C. (2013) Donkey domestication. *African Archaeological Review*, 30, 83-95.
137. Kimura B., Marshall F.B., Chen S., Rosenbom S., Moehlman P.D. et al. (2011) Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 278, 50-57.
138. Kimura M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217(5129), 624-626.
139. King J. L., Jukes T. H. (1969) Non-darwinian evolution. *Science*, 164(3881), 788-798.
140. Krüger K., Gaillard C., Stranzinger G., Rieder S. (2005) Phylogenetic analysis and species allocation of individual equids using microsatellite data. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122(s1), 78-86.
141. Kugler W., Grunenfelder H.P., Broxham E. (2008) Donkey breeds in Europe. Monitoring Institute for rare breeds and seeds in Europe, St. Gallen, Switzerland.

142. Kumar S., Gupta J., Kumar N., Dikshit K., Navani N., Jain P., Nagarajan M. (2006) Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. *Molecular ecology*, 15(3), 593-600.
143. Larson G., Albarella U., Dobney K., Rowley-Conwy P., Schibler J., Tresset A., Bălăşescu A. (2007) Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15276-15281.
144. Larson G., Dobney K., Albarella U., Fang M., Matisoo-Smith E., Robins J., Rowley-Conwy P. (2005). Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*, 307(5715), 1618-1621.
145. Larson G., Piperno D. R., Allaby R. G., Purugganan M. D., Andersson L., Arroyo-Kalin M., Doust A. N. (2014) Current perspectives and the future of domestication studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6139-6146.
146. Lei C. Z., Su R., Bower M. A., Edwards C. J., Wang X. B., Weining S., Zhang Y. S. (2009) Multiple maternal origins of native modern and ancient horse populations in China. *Animal Genetics*, 40, 933-944.
147. Lenstra J.A., Groeneveld L.F. Eding H., Kantanen J., Williams J.L. et al. (2012). Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. *Animal Genetics* 43, 483-502.
148. Lenstra J.A., The European Cattle Genetic Diversity Consortium (2006) Marker-assisted conservation of European cattle breeds: an evaluation. *Animal Genetics* 37, 475-81.
149. Li Y-C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453-2465

150. Lindsay E. H., Opdyke N. D., Johnson N. M. (1980) Pliocene dispersal of the horse *Equus* and late Cenozoic mammalian dispersal events. *Nature*, 287(5778), 135-138.
151. Loftus R. T., Ertugrul O., Harba A. H., El-Barody M. A. A., MacHugh D. E., Park S. D. E., Bradley D. G. (1999) A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. *Molecular Ecology*, 8, 2015-2022.
152. Lopes M. S., Mendonça D., Cymbron T., Valera M., Costa-Ferreira D., da Câmara Machado A. (2005) The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation. *Animal Genetics*, 36, 196-202.
153. Luikart G., Gielly L., Excoffier L., Vigne J. D., Bouvet J., Taberlet P. (2001) Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 5927-5932.
154. MacFadden B. J. (1986) Fossil horses from "Eohippus" (*Hyracotherium*) to *Equus*: scaling, Cope's Law, and the evolution of body size. *Paleobiology*, 12(04), 355-369.
155. Maloiy G. M. (1970) Water economy of the Somali donkey. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 219(5), 1522-1527.
156. Maloiy G. M. O., Boarer C. D. H. (1971) Response of the Somali donkey to dehydration: hematological changes. *American Journal of Physiology*, 221(1), 37-41.
157. Margulis L. (1981) Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the early earth.
158. Marshall F. (2000) The origins and spread of domestic animals in East Africa. *The origins and development of African livestock: Archaeology, genetics, linguistics and ethnography*, 191-221.
159. Marshall F. (2007) African pastoral perspectives on domestication of the donkey. In: Denham T.P., Iriarte J., Vrydaghs L. (eds) *Rethinking*

- agriculture: archaeological and ethnoarchaeological perspectives. *One World Archaeology Series*, Left Coast Press, Walnut Creek, CA, 371-407.
160. Marshall F., Hildebrand E. (2002) Cattle before crops: the beginnings of food production in Africa. *Journal of World Prehistory*, 16(2), 99-143.
161. Marshall F., Weissbrod L. (2009) The consequences of women's use of donkeys for pastoral flexibility: Maasai ethnoarchaeology. Tracking down the past. *Ethnohistory meets archaeozoology. Documenta Archaeobiologiae*, 7, 59-79.
162. Marshall F., Weissbrod L. (2011) Domestication processes and morphological change: through the lens of the donkey and African pastoralism. *Current Anthropology*, 52(S4), S397-S413.
163. Martín-Burriel I., Rodellar C., Lenstra J. A., Sanz A., Cons C., Osta R., Zaragoza P. (2007) Genetic diversity and relationships of endangered Spanish cattle breeds. *Journal of Heredity*, 98(7), 687-691.
164. Matassino D., Cecchi F., Ciani F., Incoronato C., Occidente M. et al. (2014) Genetic diversity and variability in two Italian autochthonous donkey genetic types assessed by microsatellite markers. *Italian Journal of Animal Science* 13, 53-60.
165. Matukumalli L. K., Lawley C. T., Schnabel R. D., Taylor J. F., Allan M. F., Heaton M. P., Van Tassell C. P. (2009) Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PloS one*, 4(4), e5350.
166. McCue M. E., Bannasch D. L., Petersen J. L., Gurr J., Bailey E., Binns M. M., Leeb T. (2012) A high density SNP array for the domestic horse and extant *Perissodactyla*: utility for association mapping, genetic diversity, and phylogeny studies. *PLoS Genet*, 8(1), e1002451.
167. Meadows J. R. S., Li K., Kantanen J., Tapio M., Sipos W., Pardeshi V., Kijas, J. W. (2005) Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow

- between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *Journal of Heredity*, 96(5), 494-501.
168. Meadows J. R., Cemal I., Karaca O., Gootwine E., Kijas J. W. (2007) Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East. *Genetics*, 175(3), 1371-1379.
169. Meyer DJ, Harvey JW, editors. *Veterinary laboratory medicine*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998.
170. Mills R. E., Luttig C. T., Larkins C. E., Beauchamp A., Tsui C., Pittard W. S., Devine S. E. (2006) An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome research*, 16(9), 1182-1190.
171. Minqiang W., Weigend S., Barre-Dirie A., Carnwath J. W., Zhonglin L., Niemann H. (2003) Analysis of two Chinese yak (*Bos grunniens*) populations using bovine microsatellite primers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120, 237-244.
172. Mittmann E. H., Lampe V., Momke S., Zeitz A., Distl O. (2010) Characterization of a Minimal Microsatellite Set for Whole Genome Scans Informative in Warmblood and Coldblood Horse Breeds. *Journal of Heredity* 101, 246-50.
173. Moehlman P. D. (2002) Status and action plan for the African wild ass (*Equus africanus*). In *Equids: Zebras, asses and horses. Status survey and conservation action plan*. IUCN/SSC Equid Specialist Group, P. D. Moehlman (ed.), pp. 2-10. Gland, Switzerland: IUCN Publications.
174. Moehlman P.D., Kebede F., Yohannes H. (2015) *Equus africanus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T7949A45170994
175. Moioli B., Georgoudis A., Napolitano F., Catillo G., Giubilei E., Ligda C., Hassanane M. (2001). Genetic diversity between Italian, Greek and Egyptian buffalo populations. *Livestock Production Science*, 70, 203-211.

176. Monti G., Bertino E., Muratore M.C., Coscia A., Cresi F., Silvestro L., Fabris C., Fortunato D., Giuffrida M.G., Conti A. (2007) Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo and in vitro study. *Pediatric Allergy and Immunology* 18, 258-264.
177. Mori E., Fernandes W. R., Mirandola R. M., Kubo G., Ferreira R. R., Oliveira J. V., Gacek F. (2003) Reference values on serum biochemical parameters of Brazilian donkey (*Equus asinus*) breed. *Journal of Equine Veterinary Science*, 23(8), 358-364.
178. Morin P. A., Luikart G., Wayne R. K. (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(4), 208-216.
179. Murray G. W. (1935) *Sons of Ishmael: A study of the Egyptian Bedouin*. London: Routledge & Sons, Ltd.
180. Muzzolini A. (2000) Livestock in Saharan rock art. The origins and development of African livestock: Archaeology, genetics, linguistics and ethnography, 87-110.
181. Naderi S., Rezaei H. R., Pompanon F., Blum M. G., Negrini R., Naghash H. R., Kence A. (2008) The goat domestication process inferred from large-scale mitochondrial DNA analysis of wild and domestic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(46), 17659-17664.
182. Naderi S., Rezaei H. R., Pompanon F., Blum M. G., Negrini R., Naghash H. R., Kence A. (2008) The goat domestication process inferred from large-scale mitochondrial DNA analysis of wild and domestic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(46), 17659-17664.
183. Nguyen T. T., Genini S., Menetrey F., Malek M., Vögeli P., Goe M. R., Stranzinger G. (2005) Application of bovine microsatellite markers for genetic diversity analysis of Swiss yak (*Poephagus grunniens*). *Animal Genetics*, 36(6), 484-489.

184. Nicolaisen J. (1963) Ecology and culture of the pastoral Tuareg: with particular reference to the Tuareg of Ahaggar and Ayr (Vol. 9). Copenhagen, National Museum.
185. Oakenfull E. A., Lim H. N., Ryder O. A. (2000) A survey of equid mitochondrial DNA: Implications for the evolution, genetic diversity and conservation of Equus. *Conservation Genetics*, 1(4), 341-355.
186. Oki Y., Oliver W. T., Funnell H. S. (1964) Multiple forms of cholinesterase in horse plasma. *Nature*, 203, 605-606.
187. Ollivier L., Alderson L., Gandini G. C., Foulley J. L., Haley C. S., Joosten R., Boscher M. Y. (2005) An assessment of European pig diversity using molecular markers: Partitioning of diversity among breeds. *Conservation Genetics*, 6, 729-741.
188. Ometto L., Stephan W., De Lorenzo D. (2005) Insertion/deletion and nucleotide polymorphism data reveal constraints in *Drosophila melanogaster* introns and intergenic regions. *Genetics*, 169(3), 1521-1527.
189. Orlando L., Metcalf J. L., Alberdi M. T., Telles-Antunes M., Bonjean D., Otte M., Prado J. L. (2009) Revising the recent evolutionary history of equids using ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21754-21759.
190. Papa L, Kume K (2012) The results of identification and characterisation of the donkey population in Albania. *Agr Forest*, 58:125-134.
191. Pejić N: Konj (*Equus caballus*). Novi Sad, Serbia: Faculty of Agriculture Novi Sad, 1996.
192. Pellicchia M., Colli L., Bigi D., Zambonelli P., Supplizi V. et al. (2010) Mitochondrial DNA diversity of five Italian autochthonous donkey breeds. *Italian Journal of Animal Science* 6, 185.

193. Perego U. A., Achilli A., Angerhofer N., Accetturo M., Pala M., Olivieri A., Myres N. M. (2009) Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Current biology*, 19(1), 1-8.
194. Pérez-Enciso M., Ferretti L. (2010) Massive parallel sequencing in animal genetics: wherefroms and wheretos. *Animal Genetics*, 41, 561-569.
195. Pérez-Pardal L., Grizelj J., Traoré A., Cubric-Curik V., Arsenos G. et al. (2013) Lack of mitochondrial DNA structure in Balkan donkey is consistent with a quick spread of the species after domestication. *Animal Genetics* 45, 144-47.
196. Peter C., Bruford M., Perez T., Dalamitra S., Hewitt G., Erhardt G. (2007) Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Animal Genetics*, 38, 37-44.
197. Pitel P. H., Moulin M., Valette J. P., Dumontier S., Petit L., Fortier G., Coroucé-Malblanc A. (2006) Approche des valeurs hématologiques et biochimiques chez deux races asines. *Pratique Veterinaire Equine*, 38(149), 19.
198. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-59.
199. Pudovkin A.I., Zaykin D.V., Hedgecock D. (1996) On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics* 144, 383-387.
200. Qanbari S., Hansen M., Weigend S., Preisinger R., Simianer H. (2010) Linkage disequilibrium reveals different demographic history in egg laying chickens. *BMC genetics*, 11, 103.
201. Ramos A. M., Crooijmans R. P., Affara N. A., Amaral A. J., Archibald A. L., Beaver J. E., Hansen M. S. (2009) Design of a high density SNP genotyping

- assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *PloS one*, 4(8), e6524.
202. Raudsepp T., Chowdhary B. P. (1999) Construction of chromosome-specific paints for meta-and submetacentric autosomes and the sex chromosomes in the horse and their use to detect homologous chromosomal segments in the donkey. *Chromosome research*, 7(2), 103-114.
203. Raudsepp T., Christensen K., Chowdhary B. P. (2000) Cytogenetics of donkey chromosomes: nomenclature proposal based on GTG-banded chromosomes and depiction of NORs and telomeric sites. *Chromosome Research*, 8(8), 659-670.
204. Raudsepp T., Mariat D., Guérin G., Chowdhary B. P. (2002) Comparative FISH mapping of 32 loci reveals new homologous regions between donkey and horse karyotypes. *Cytogenetic and Genome Research*, 94(3-4), 180-185.
205. Rischkowsky B., Pilling D. (2007) The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization.
206. Riva J., Rizzi R., Marelli S., Cavalchini L. G. (2004) Body measurements in Bergamasca sheep. *Small Ruminant Research*, 55(1), 221-227.
207. Røed K. H., Flagstad Ø., Nieminen M., Holand Ø., Dwyer M. J., Røv N., Vilà C. (2008). Genetic analyses reveal independent domestication origins of Eurasian reindeer. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1645), 1849-1855.
208. Rong R., Chandley A. C., Song J., McBeath S., Tan P. P., Bai Q., Speed R. M. (1988) A fertile mule and hinny in China. *Cytogenetic and Genome Research*, 47(3), 134-139.
209. Rosenbom S., Costa V., Al-Araimi N., Kefena E., Abdel-Moneim A.S. et al. (2015) Genetic diversity of donkey populations from the putative centers of domestication. *Animal Genetics* 46, 30–36.

210. Rosenbom S., Costa V., Steck B., Moehlman P., Beja-Pereira A. (2011) Cross-species genetic markers: a useful tool to study the world's most threatened wild equid—*Equus africanus*. *European journal of wildlife research*, 58(3), 609-613.
211. Rossel S., Marshall F., Peters J., Pilgram T., Adams M. D., O'Connor D. (2008) Domestication of the donkey: Timing, processes, and indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3715-3720.
212. Rousset F. (2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103-6.
213. Rout P. K., Joshi M. B., Mandal A., Laloe D., Singh L., Thangaraj K. (2008) Microsatellite-based phylogeny of Indian domestic goats. *BMC genetics*, 9(1), 11.
214. Ryder O. A., Chemnick L. G., Bowling A. T., Benirschke K. (1985) Male mule foal qualifies as the offspring of a female mule and jack donkey. *Journal of Heredity*, 76(5), 379-381.
215. Ryder O. A., Epel N. C., Benirschke K. (1978) Chromosome banding studies of the Equidae. *Cytogenetic and Genome Research*, 20(1-6), 323-350.
216. Salathia N., Lee H. N., Sangster T. A., Morneau K., Landry C. R., Schellenberg K., Queitsch C. (2007) TECHNICAL ADVANCE: Indel arrays: an affordable alternative for genotyping. *The Plant Journal*, 51(4), 727-737.
217. SanCristobal M., Chevalet C., Haley C. S., Joosten R., Rattink A. P., Harlizius B., Law A. (2006). Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 37(3), 189-198.
218. Santos-Silva F., Ivo R. S., Sousa M. C. O., Carolino M. I., Ginja C., Gama L. T. (2008) Assessing genetic diversity and differentiation in Portuguese

- coarse-wool sheep breeds with microsatellite markers. *Small Ruminant Research*, 78(1), 32-40.
219. Satue K., Blanco O., Munoz A. (2009) Age-related differences in the hematological profile of Andalusian broodmares of Carthusian strain. *Veterinari Medicina*, 54(4), 175-182.
220. Savolainen P., Zhang Y. P., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. (2002) Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298(5598), 1610-1613.
221. Schlötterer C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365-371.
222. Schlötterer C. (2004) The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics*, 5(1), 63-69.
223. Schopen G. C. B., Bovenhuis H., Visker M. H. P. W., Van Arendonk J. A. M. (2008) Comparison of information content for microsatellites and SNPs in poultry and cattle. *Animal Genetics*, 39, 451-453.
224. Sgorbini M., Bonelli F., Rota A., Baragli P., Marchetti V., Corazza M. (2013) Hematology and clinical chemistry in Amiata donkey foals from birth to 2 months of age. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(1), 35-39.
225. Simpson G.G., (1951) *Horses: the story of the horse family in the modern world and through sixty million years of history*. Oxford University Press, New York
226. Slatkin M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 264-279.
227. Slatkin M. (2008). Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 477-485.

228. Službeni glasnik Republike Srbije (2010) Pravilnik o listi genetskih rezervi domaćih životinja, načinu očuvanja genetskih rezervi domaćih životinja, kao i o listi autohtonih rasa domaćih životinja i ugroženih autohtonih rasa Službeni glasnik Republike Srbije, 38/10, 1-6.
229. Smith B.D. (1997) The initial domestication of Cucurbita pepo in the Americas 10,000 years ago. *Science*, 276 (5314), 932-934.
230. Smith M. J., Pascal C. E., Grauvogel Z. A. C., Habicht C., Seeb J. E., Seeb L. W. (2011) Multiplex preamplification PCR and microsatellite validation enables accurate single nucleotide polymorphism genotyping of historical fish scales. *Molecular ecology resources*, 11(s1), 268-277.
231. Smith T., Rose K. D., Gingerich P. D. (2006) Rapid Asia–Europe–North America geographic dispersal of earliest Eocene primate *Teilhardina* during the Paleocene–Eocene thermal maximum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11223-11227.
232. Smith T., Solé F., Missiaen P., Rana R. S., Kumar K., Sahni A., Rose K. D. (2015) First early Eocene tapiroid from India and its implication for the paleobiogeographic origin of perissodactyls. *Palaeovertebrata*, 39(2), e5.
233. Soares P., Ermini L., Thomson N., Mormina M., Rito T., Röhl A., Richards M. B. (2009) Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *The American Journal of Human Genetics*, 84(6), 740-759.
234. Sow A, Kalandi KM, Ndiaye NP, Bathily A, Sawadogo GJ: Clinical biochemical parameters of Burkinabese local donkeys' breeds. *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics* 2012, 2:84-89.
235. Stanimirovic Z., Vucinic M., Stevanovic J. (1999) Značaj očuvanja biodiverziteta domaćih životinja. *Savremena poljoprivreda*, 48(1-2), 17-23.

236. Stanistic Lj., Dimitrijevic V., Simeunovic P., Lakic N., Radovic I., Ivankovic A., Stevanovic J., Stanimirovic Z. (2015a) Morphological, biochemical and hematological characterization of endangered Balkan donkey breed. *Acta Veterinaria-Beograd* 65, 125-36.
237. Stanistic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015b) *Equus asinus* isolate 60KO tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial. GenBank Accession No. KR081377.1
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KR081377>
238. Stanistic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015c) *Equus asinus* isolate 17ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial. GenBank Accession No. KR081378.1,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KR081378>
239. Stanistic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015d) *Equus asinus* isolate 7ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial. GenBank Accession No. KR081379,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KR081379>
240. Stanistic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015e) *Equus asinus* isolate 14ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial.

- GenBank Accession No. KR081380,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081380>
241. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015f) *Equus asinus* isolate 25ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial.
- GenBank Accession No. KR081381,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081381>
242. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015g) *Equus asinus* isolate 30ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial.
- GenBank Accession No. KR081382,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081382>
243. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015h) *Equus asinus* isolate 12ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial.
- GenBank Accession No. KR081383,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081383>
244. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015j) *Equus asinus* isolate 15ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial.
- GenBank Accession No. KR081384,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081384>

245. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015k) *Equus asinus* isolate 67KO tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial. GenBank Accession No. KR081385, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081385>
246. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015l) *Equus asinus* isolate 55SP tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial. GenBank Accession No. KR081386, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081386>
247. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015m) *Equus asinus* isolate 65KO tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial. GenBank Accession No. KR081387, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081387>
248. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015n) *Equus asinus* isolate 6ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial. GenBank Accession No. KR081388, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081388>
249. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015o) *Equus asinus* isolate 50SP tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene,

- complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial.
GenBank Accession No. KR081389,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081389>
250. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag,
Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015p) *Equus*
asinus isolate 10ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene,
complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial.
GenBank Accession No. KR081390,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081390>
251. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag,
Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015q) *Equus*
asinus isolate 21ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene,
complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial.
GenBank Accession No. KR081391,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081391>
252. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag,
Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015r) *Equus*
asinus isolate 49SP tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene,
complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial.
GenBank Accession No. KR081392,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081392>
253. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag,
Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015s) *Equus*
asinus isolate 32ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene,
complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial.
GenBank Accession No. KR081393,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR081393>

254. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015t) Equus asinus isolate 23ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial. GenBank Accession No. KR081394, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KR081394>
255. Stanisic Ljubodrag, Dimitrijevic Vladimir, Gajic Bojan, Simeunovic Predrag, Glavinic Uros, Stevanovic Jevrosima, Stanimirovic Zoran (2015u) Equus asinus isolate 31ZA tRNA-Thr gene, partial sequence; tRNA-Pro gene, complete sequence; and control region, partial sequence; mitochondrial. GenBank Accession No. KR081395, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KR081395>
256. Stanković M. (2006) Guide through the nature of the Special Natural Reserve Zasavica, Sremska Mitrovica: Pokret gorana Sremska Mitrovica, pp. 7-11, 214-9.
257. Stoneking M., Sherry S. T., Redd A. J., Vigilant L. (1992) New approaches to dating suggest a recent age for the human mtDNA ancestor. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 337(1280), 167-175.
258. Stormont C., Suzuki Y. (1963) Genetic Control of Albumin Phenotypes in Horses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 114(3), 673-675.
259. Taberlet P., Valentini A., Rezaei H. R., Naderi S., Pompanon F., Negrini R., Ajmone-Marsan P. (2008) Are cattle, sheep, and goats endangered species?. *Molecular Ecology*, 17(1), 275-284.
260. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) using

- maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
261. Tapio M., Marzanov N., Ozerov M., Činkulov M., Gonzarenko G., Kiselyova T., Kantanen J. (2006) Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Molecular Biology and Evolution*, 23(9), 1776-1783.
262. Tapio M., Tapio I., Grislis Z., Holm L. E., Jeppsson S., Kantanen J., Eythorsdottir E. (2005) Native breeds demonstrate high contributions to the molecular variation in northern European sheep. *Molecular Ecology*, 14(13), 3951-3963.
263. Tesfaye T., Mamo G., Endebu B., Abayneh T. (2014) Comparative serum biochemical profiles of three types of donkeys in Ethiopia. *Comparative Clinical Pathology*, 23(1), 205-212.
264. Tozaki T., Takezaki N., Hasegawa T., Ishida N., Kurosawa M., Tomita M., ... Mukoyama H. (2003) Microsatellite variation in Japanese and Asian horses and their phylogenetic relationship using a European horse outgroup. *Journal of Heredity*, 94(5), 374-380.
265. Traoré A., Álvarez I., Tambourá H. H., Fernández I., Kaboré A., Royo L. J., Sawadogo L. (2009) Genetic characterisation of Burkina Faso goats using microsatellite polymorphism. *Livestock science*, 123(2), 322-328.
266. Troy C. S., MacHugh D. E., Bailey J. F., Magee D. A., Loftus R. T., Cunningham P., Bradley D. G. (2001) Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature*, 410 (6832), 1088-1091.
267. Uerpmann H. P. (1991). *Equus africanus* in Arabia. *Equids in the ancient world*, 2, 12-33.

268. Van de Goor L. H. P., Panneman H., Van Haeringen W. A. (2010) A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci. *Animal Genetics* 41, 122-27.
269. Van de Goor L. H. P., Van Haeringen W. A., Lenstra J.A. (2011) Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis. *Animal Genetics* 42, 627-33.
270. Veronesi M. C., Gloria A., Panzani S., Sfirro M. P., Carluccio A., Contri A. (2014) Blood analysis in newborn donkeys: hematology, biochemistry, and blood gases analysis. *Theriogenology*, 82(2), 294-303.
271. Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34(3), 275-306.
272. Vigne J. D. (2011) The origins of animal domestication and husbandry: a major change in the history of humanity and the biosphere. *Comptes rendus biologies*, 334(3), 171-181.
273. Vijh R. K., Tania M. S., Mishra B., Bharani Kumar S. T. (2008) Genetic relationship and diversity analysis of Indian water buffalo. *Journal of Animal Science*, 86, 1495-1502.
274. Vilà C., Leonard J. A., Götherström A., Marklund S., Sandberg K., Lidén K., Ellegren H. (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. *Science*, 291(5503), 474-477.
275. Vilá C., Leonard J.A. & Beja-Pereira A. (2006) Genetic documentation of horse and donkey domestication. In: Zeder M.A., Bradley D.G., Emshwiller, E. & Smith B.D. (eds) *Documenting domestication*, University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California, USA, 342-53.

276. Vilstrup J. T., Seguin-Orlando A., Stiller M., Ginolhac A., Raghavan M., Nielsen S. C., Clary J. (2013) Mitochondrial phylogenomics of modern and ancient equids. *PLoS One*, 8(2), e55950.
277. Visscher P. M., Smith D., Hall S. J., Williams J. L. (2001) A viable herd of genetically uniform cattle. *Nature*, 409(6818), 303-303.
278. Wad C. M., Giulotto E., Sigurdsson S., Zoli M., Gnerre S., Imsland F., Blöcker, H. (2009) Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 326(5954), 865-867.
279. Webster M. T., Hagberg J. (2007) Is there evidence for convergent evolution around human microsatellites? *Molecular biology and evolution*, 24(5), 1097-1100.
280. Whittaker J. C., Harbord R. M., Boxall N., Mackay I., Dawson G., Sibly R. M. (2003) Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics*, 164(2), 781-787.
281. Wikipedia contributors. D-loop. Wikipedia, The Free Encyclopedia. November 22, 2016, 18:19 UTC. Available at: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=D-loop&oldid=750989224>. Accessed February 11, 2017.
282. Wu G. S., Yao Y. G., Qu K. X., Ding Z. L., Li H., Palanichamy M. G., Zhang, Y. P. (2007) Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia. *Genome Biology*, 8, R245.
283. Wyman A. R., White R. (1980) A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), 6754-6758.
284. Xu X., Árnason Ú. (1994) The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene*, 148, 357-362.

285. Xu X., Gullberg A., Arnason U. (1996) The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species-pairs. *Journal of Molecular Evolution* 43, 438-46.
286. Xuebin Q., Jianlin H., Lkhagva B., Chekarova I., Badamdorj D., Rege J. E. O., Hanotte O. (2005) Genetic diversity and differentiation of Mongolian and Russian yak populations. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122, 117-126.
287. Yakubu, A. S., Chafe, U. M. (2008) Haematological studies of donkeys in Sokoto state, Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 7(1).
288. Yang F., Fu B., O'brien P. C., Nie W., Ryder O. A., Ferguson-Smith M. A. (2004) Refined genome-wide comparative map of the domestic horse, donkey and human based on cross-species chromosome painting: insight into the occasional fertility of mules. *Chromosome Research*, 12(1), 65-76.
289. Zabek T., Fornal A. (2009) Evaluation of the 17-plex STR kit for parentage testing of polish Coldblood and Hucul horses. *Annals of Animal Science* 9, 363-72.
290. Zeder M. A. (2006) Documenting domestication: new genetic and archaeological paradigms. Univ of California Press.
291. Zhang H., Pajman J. L., Chang F., Wu X., Chen G., Lei C., O'Connor T. (2013) Morphological and genetic evidence for early Holocene cattle management in northeastern China. *Nature communications*, 4.
292. Zhang Y. S., Yang X. Y., Wang X. B., Zhang C. M., Qin F., Zhou Z. H., Lei C. Z. (2010) Cytochrome b genetic diversity and maternal origin of Chinese domestic donkey. *Biochemical Genetics*, 48, 636-646.
293. Zhang Y., Sun D., Yu Y. (2007) Genetic diversity and differentiation of Chinese domestic buffalo based on 30 microsatellite markers. *Animal Genetics*, 38, 569-575.

294. Zhu W., Su Y., Liu Y., Ni I., Wu I. (2013) Microsatellite polymorphism analysis of Yang Yuan donkey in China. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 12, 795-97.
295. Zinkl JG, Mae D, Merida GP, Farver TB, Humble JA (1990) Reference ranges and the influence of age and sex on hematologic and serum biochemical values in donkeys (*Equus asinus*). *American Journal of Veterinary Research*, 51:408-41.
296. Zuckerkandl E., Pauling L. (1962) Molecular disease, evolution and genetic heterogeneity.

Biografija

Ljubodrag Dragan Stanišić je rođen 29.10.1986. godine u Beogradu. Pohađao je Osnovnu školu "Jovan Popović" i srednju školu, Gimnaziju u Obrenovcu. Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu upisuje 2005. godine i završava 2011. godine, sa prosečnom ocenom od 8,65.

Po završetku fakulteta pripravnički staž odrađuje 2011/2012. godine u Veterinarskoj stanici „Simbiozis vet“ u Obrenovcu, nakon čega polaže stručni ispit. Doktorske studije upisuje u oktobru 2011. godine. Na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine zaposlen je 01. aprila 2013. godine kao istraživač saradnik na interdisciplinarnom projektu III46002 („Molekularno-genetička i ekofiziološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnji bezbedne hrane“), pod rukovodstvom prof. dr Zorana Stanimirovića. Aktivno je učestvovao u izvođenju praktične nastave na predmetima: Zoologija, Uzgoj i nega pčela, Uzgoj i nega životinja u Zoo vrtovima i Uzgoj i nega lovne divljači. Pored poslova nastave, zadužen je za rad u Laboratoriji za genetiku životinja na Katedri za biologiju, Fakulteta veterinarske medicine. Od oktobra 2016. godine zaposlen je na Katedri za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje kao asistent gde se nalazi i danas. Kandidat Ljubodrag Stanišić do sada je objavio ukupno 16 radova, od toga 6 radova u međunarodnim časopisima kategorije M20 (2 rada kategorije M21, 2 rada kategorije M22 i 2 rada kategorije M23) i 10 radova u vidu saopštenja u celini ili u izvodu na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja (2 rada kategorije M33, 4 rada kategorije M61, 3 rada kategorije M63 i 1 rad kategorije M64). Pored toga 19 novih haplotipa/sekvenci deponovao je u genskoj banci u kategoriji M85. Proveo je 4 nedelje u novembru i decembru 2016. godine na Klinici za reprodukciju velikih životinja Veterinarskog fakulteta u Ljubljani. Oženjen je Jelenom, otac Kaje i Vasilija.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani **Ljubodrag Stanišić**

broj indeksa 17/9

Izjavljujem

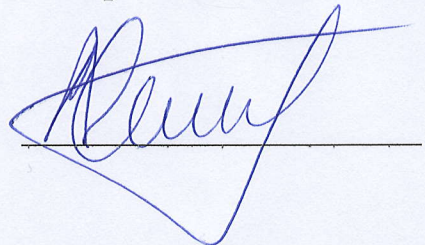
da je doktorska disertacija pod naslovom

Fenotipska i molekularno-genetička karakterizacija populacije balkanskog magarca u Republici Srbiji

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.06.2017. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Ljubodrag Stanišić**

Broj upisa: 17/9

Studijski program: doktorske studije

Naslov rada: **Fenotipska i molekularno-genetička karakterizacija populacije balkanskog magarca u Republici Srbiji**

Mentor: Dr Jevrosima Stevanović (mentor 1), Dr Vladimir Dimitrijević (mentor 2)

Potpisani **Ljubodrag Stanišić**

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 19.06.2017. godine

Potpis doktoranda



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Fenotipska i molekularno-genetička karakterizacija populacije balkanskog magarca u Republici Srbiji

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.06.2017. godine

