

**PROTOKOLI ZA SAKUPLJANJE
I POHRANU GENETSKOG MATERIJALA U
BANKU GENA
AGENCIJE ZA RURALNI RAZVOJ ISTRE**

listopad, 2023.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 STRATEGIJE OČUVANJA PASMINA	1
2. ISTARSKA BANKA GENA (IBAG).....	3
3. PLAN PRIKUPLJANJA BIOLOŠKIH UZORAKA ZA POHRANU U ISTARSKU BANKU GENA DOMAĆIH ŽIVOTINJA (IBAG)	4
4. PROTOKOLI ZA SAKUPLJANJE I POHRANU BIOLOŠKOG MATERIJALA..	7
4.1 DLAKA	7
Dlaka (griva) kao biološki uzorak	7
Uzorkovanje dlake (grive) kopitara	7
Veličina uzorka dlake (grive) kopitara	8
Pohrana uzorka dlake iz grive.....	8
Specifikacija uzoraka dlake (grive)	9
Transport uzorka dlake (grive)	9
Manipulacija i pohrana uzoraka u IBAG	9
4.2 UŠNO TKIVO	10
Oprema za uzorkovanje tkiva korištenjem kliješta i kivete	11
Priprema kliješta i kivete za uzorkovanje i uzorkovanje	12
Označavanje kivete s biološkim uzorkom	13
Privremena pohrana i transport uzorka tkiva	13
Manipulacija i pohrana uzoraka u banci gena	14
4.3 KRV	15
5. POHRANA GENETSKOG MATERIJALA	16
5.1 Praćenje brojnog stanja uzoraka.....	16
5.2 Tehnički uvjeti za čuvanje uzoraka biološkog materijala.....	17
Evidencija uzorka.....	17
Tehnički aspekti rada banke gena	17
Sigurnost	19
6. PLANOVI ZA BUDUĆNOST.....	21
7. EDUKACIJA I ISTRAŽIVAČKO RAZVOJNI DIO RADA ISTARSKE BANKE GENA.....	24
8. LITERATURA	25

1. UVOD

Gospodarski razvoj, rast i mobilnost stanovništva povećali su potražnju za proizvodima animalnog porijekla što je izazvalo veliki pritisak na stočarsku granu proizvodnje. U cilju zadovoljenja sve veće potražnje i stalno prilagođavanje raspoloživih životinjskih genetskih resursa, nužno je pronaći model kako povećati proizvodnu učinkovitost što nerijetko rezultira gubitkom genetske raznolikosti neke populacije. Stoga je pitanje održivosti životinjskih genetskih resursa na globalnoj razini od iznimne važnosti. Navedeno je prepoznato na nacionalnim i globalnim raznima što rezultira usvajanjem mnogobrojnih akcijskih planova sa ciljem poboljšanja održive upotrebe, razvoja i očuvanja animalnih genetskih resursa diljem svijeta (FAO, 2007; 2015).

I Republika Hrvatska našla se u vrtlogu brojnih promjena koje su kao posljedica slobodnog tržišta i masovne proizvodnje dovele u pitanje opstanak mnogih životinjskih vrsta, posebice izvornih pasmina domaćih životinja. Izvorne pasmine domaćih životinja važne su za održavanje poljoprivrede i krajolika, očuvanja tradicije i povijesti nekog podneblja. Održivo korištenje životinjskih genetskih izvora, naročito izvornih, ali i ugroženih pasmina, zahtijeva usklađene aktivnosti kao i povezivanje dionika u očuvanju životinjskih genetskih izvora. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske nositelj je Nacionalnog programa očuvanja izvornih i ugroženih pasmina 2021.-2025. i Banke gena domaćih životinja Republike Hrvatske te je ujedno i koordinator provedbe svih aktivnosti definiranih Nacionalnim programom. Agencija za ruralni razvoj Istre (u dalnjem tekstu AZRRI) aktivno sudjeluje u provedbi uzgojnih programa i aktivnostima očuvanja izvornih pasmina Istre kao treća strana. Ministarstvo poljoprivrede je 20. kolovoza 2019. godine izdalo „Rješenje za provedbu testiranja rasta, razvoja i proizvodnih odlika (fenotip) uzgojno valjanih životinja pasmine istarski magarac“ i 03. listopada i 2019. godine „Rješenje za provedbu testiranja rasta, razvoja i proizvodnih odlika (fenotip) uzgojno valjanih životinja pasmine istarsko govedo“ u čijoj provedbi sudjeluju kao treća strana. Sukladno preporukama Svjetske organizacije za poljoprivredu (FAO) i Nacionalnom programu očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025., AZRRI je osnovao Istarsku banku animalnih gena (IBAG) za što je izdano „Rješenje o priznavanju statusa banke gena“ 13. studenog 2020. godine od strane Ministarstva poljoprivrede. IBAG je time postao sastavni dio hrvatske nacionalne mreže banaka animalnih gena.

1.1 STRATEGIJE OČUVANJA PASMINA

Najpoznatije strategije koje se primjenjuju u očuvanju animalnih genetskih resursa su *in situ* i *ex situ* strategije. *In situ* strategija predstavlja temeljni oblik zaštite izvornih pasmina domaćih životinja koje se čuvaju u izvornom staništu u dovoljnoj brojnosti. Oblik zaštite izvornih pasmina domaćih životinja van izvornog staništa i proizvodnih sustava u kojima se resurs razvio je *ex situ* model koji podržava pristup *in vivo* očuvanja (očuvanje jedinki u zoološkim vrtovima, parkovima prirode, itd) i *in vitro* očuvanja (pohrana germinativnog i tkivnog materijala u banku gena; FAO, 2012).

Banka gena predstavlja repozitorij životinjskog genetskog materijala od pasmina lokalnog, regionalnog i globalnog značenja. Genetski materijal koji je pohranjen u Banku gena predstavlja javno dobro, te sukladno tome odgovorne službe brinu o njenom funkcioniranju. U postupcima prikupljanja i pohranjivanja biološkog materijala domaćih životinja u Središnju banku animalnih gena Republike Hrvatske prihvata se regulativa i metodologija definirana u međunarodnom aktu FAO Smjernicama za Kriokonzervaciju animalnih genetskih resursa (*eng. Guidelines for the Cryoconservtions of Animal Genetic Resoruces*, Roma, Italy) iz 2010. godine, kao i isti akt sa svim možebitnim izmjenama u budućnosti. Ovo je značajno kako bi se hrvatska Banka animalnih gena uskladila s radom istih institucija na međunarodnoj razini.

2. ISTARSKA BANKA GENA (IBAG)

Istarska banka gena je regionalna banka gena kojoj je cilj prikupljanje, klasificiranje, identificiranje i očuvanje animalnih genetskih resursa. Za učinkovit rad IBAG potrebno je uzeti u obzir čimbenike kao što su: vrsta životinja, pasmina, vrsta biološkog materijala, količina biološkog materijala za pohranu i drugo. Dinamika prikupljanja i pohrane genetskog materijala (tkivno i zametno staničje) istarskih izvornih pasmina u IBAG ovisi o mogućnostima prikupljanja tkiva, tehnikama pohrane i uporabe genetskog materijala, statusu ugroženosti pasmine i okruženju. Prikupljen i pohranjen biološki materijal u IBAG u svrhu očuvanja izvornih i zaštićenih pasmina može biti korišten više namjena, a to su:

- dugoročna pohrana biološkog materijala,
- praćenje genetskih populacijskih parametara (uzgoj u srodstvu, efektivna veličina populacije i drugo),
- potvrda roditeljstva (*eng. paternity testing*),
- izračun uzgojnih vrijednosti,
- utvrđivanje genetskih defekata u populaciji,
- znanstvene svrhe.

U IBAG regionalnih izvornih pasmina domaćih životinja prikuplja se slijedeći biološki materijal:

- tkivo – prikupljanje tkiva provodi se sukladno „Proceduri za prikupljanje bioloških uzoraka tkiva kivetom za potrebe IBAG“,
- dlaka – prikupljanje dlake provodi se sukladno „Proceduri prikupljanja bioloških uzoraka dlake goveda i kopitara za potrebe IBAG“
- germinativna tkiva – pohranjivanje bioloških uzoraka reproduktivnog materijala (sperma, embriji, jajne stanice).

Uspostava sustavnog prikupljanja, manipulacije, skladištenja i pohrane genetskog materijala u IBAG radi očuvanja biološke raznolikosti, a u svrhu zaštite i očuvanja izvornih i ugroženih pasmina, uključuje izradu:

- Plana prikupljanja bioloških uzoraka za pohranu u regionalnu banku gena domaćih životinja (IBAG),
- Protokola za prikupljanje, skladištenje i manipulaciju genetskog materijala,
- Protokola za tehničke uvjete čuvanja uzoraka biološkog materijala,
- Godišnjeg plana rada na očuvanju i razvoju životinjskih genetskih resursa koji je uskladen s Nacionalnim programom očuvanja izvornih i ugroženih pasmina u razdoblju 2021.-2025. i Planom prikupljanja somatskih bioloških uzoraka za pohranu u Banku gena domaćih životinja Republike Hrvatske izrađenog od strane Ministarstva poljoprivrede,
- Kontrolu unesenih podataka u bazu podataka,
- Plana edukacije i istraživačko razvojni dio rada banke gena (osobe u kontaktu s genetskim materijalom, osobe zadužene za vođenje baze podataka, osobe suradničkih institucija koje razvijaju protokole, metode i slično).

3. PLAN PRIKUPLJANJA BIOLOŠKIH UZORAKA ZA POHRANU U ISTARSKU BANKU GENA DOMAČIH ŽIVOTINJA (IBAG)

U IBAG prikuplja se genetski materijal slijedećih pasmina: istarsko govedo, istarska ovca, istarska koza i istarski magarac. Prikaz prikupljanja bioloških uzoraka spomenutih vrsta domaćih životinja obzirom na kategoriju od kojih se prikuplja biološki uzorak, vrstu biološkog materijala, vrijeme i svrhu uzorkovanja i broj uzoraka prikazani su Tablicama 1-8.

Napomena: Biološki uzorak ušnog tkiva obvezno se prikuplja od svih grla koje se umatičavaju bez porijekla kao početna grla u postupku utemeljenja pasminskog registra.

Tablica 1. Prikaz prikupljanja bioloških uzoraka **istarskog goveda** prema kategoriji od kojih se prikuplja biološki uzorak, vrsti biološkog materijala, vremenu uzorkovanja, svrsi uzorkovanja i imenovanoj organizaciji koja obavlja uzorkovanje

RB	Kategorija	Pojašnjenje	Biološki uzorak	Vrijeme uzorkovanja	Prioritetna svrha uzorkovanja	Uzorkovanje obavlja
1.	Ženska telad	sva oteljena telad	tkivo	u trenutku označavanja teleta ušnom markicom	izolacija DNK; genotipizacija; potvrda roditeljstva; praćenje genetskih populacijskih parametara;	
2.	Muška junad prijavljena za odabir	svi bikovi (HB) u rasplodu	tkivo / dlaka	u trenutku komisijeske ocjene	izolacija DNK; genotipizacija; potvrda roditeljstva; praćenje genetskih populacijskih parametara;	
3.	Rasplodni bikovi	svi bikovi (HB) u rasplodu	tkivo / dlaka	prilikom boravka na gospodarstvu/revizije prema nalogu razvojne službe	izolacija DNK; genotipizacija; potvrda roditeljstva; praćenje genetskih populacijskih parametara;	
4.	Roditelji ženske teladi, muške junadi i rasplodnih bikova	Svi koji nisu genotipizirani i još su živi	tkivo / dlaka	u trenutku uzorkovanja njihovog potomstva	izolacija DNK; genotipizacija; potvrda roditeljstva; praćenje genetskih populacijskih parametara;	

HB – herd book broj

Tablica 2. Prikaz vrste i broja bioloških uzoraka prema kategoriji **istarskog goveda**

RB	Kategorije	Vrsta uzorka	Broj uzoraka
	Ženska telad	tkivo	
1.	Muška junad prijavljena za odabir	tkivo/dlaka	
	Rasplodni bikovi	tkivo/dlaka	
	Roditelji	tkivo/dlaka	

Tablica 3. Prikaz prikupljanja bioloških uzoraka **istarske ovce** prema kategoriji od kojih se prikuplja biološki uzorak, vrsti biološkog materijala, vremenu uzorkovanja, svrsi uzorkovanja i imenovanoj organizaciji koja obavlja uzorkovanje

RB	Kategorija	Biološki uzorak	Vrijeme uzorkovanja	Svrha uzorkovanja	Uzorkovanje obavlja
1.	Mladi ovnovi prijavljeni za odabir u svrhu rasploda u matičnim stadima	tkivo	prilikom boravka na gospodarstvu	genomsko vrednovanje, praćenje genetskih populacijskih parametara	
2.	Šilježice prijavljene za daljnji uzgoj u matičnim stadima	tkivo	prilikom boravka na gospodarstvu	genomsko vrednovanje, praćenje genetskih populacijskih parametara	
3.	Ovce za daljnji uzgoj u matičnim stadima	rezidualna tkivo DNK	prilikom boravka na gospodarstvu	genomsko vrednovanje, praćenje genetskih populacijskih parametara	

Tablica 4. Prikaz vrste i broja bioloških uzoraka prema kategoriji **istarske ovce**

RB	Kategorije	Vrsta uzorka	Broj uzoraka
	Mladi ovnovi/ovnovi	tkivo	
1.	Šilježice	tkivo	
	Ovce	tkivo	

Tablica 5. Prikaz prikupljanja bioloških uzoraka **istarskog magarca** prema kategoriji od kojih se prikuplja biološki uzorak, vrsti biološkog materijala, vremenu uzorkovanja, svrsi uzorkovanja i imenovanoj organizaciji koja obavlja uzorkovanje

RB	Kategorija	Biološki uzorak	Vrijeme uzorkovanja	Svrha uzorkovanja	Uzorkovanje obavlja
1.	Magarci rođeni 2022. godine i ranije	dlaka (griva)	u trenutku boravka na gospodarstvu	potvrda roditeljstva; praćenje genetskih populacijskih parametara	
	Magarice rođene 2022. godine i ranije	dlaka (griva)	u trenutku boravka na gospodarstvu	potvrda roditeljstva; praćenje genetskih populacijskih parametara	

Tablica 6. Prikaz vrste i broja bioloških uzoraka prema kategoriji **istarskog magarca**

RB	Kategorije	Vrsta uzorka	Broj uzoraka
1.	Magarci rođeni 2022. godine i ranije	dlaka (griva)	
	Magarice rođene 2022. godine i ranije	dlaka (griva)	

Tablica 7. Prikaz prikupljanja bioloških uzoraka **istarске koze** prema kategoriji od kojih se prikuplja biološki uzorak, vrsti biološkog materijala, vremenu uzorkovanja, svrsi uzorkovanja i imenovanoj organizaciji koja obavlja uzorkovanje

RB	Kategorija	Biološki uzorak	Vrijeme uzorkovanja	Svrha uzorkovanja	Uzorkovanje obavlja
1.	Mladi jarčevi prijavljeni za odabir u svrhu rasploda u matičnim stadiма	tkivo	u trenutku komisjske ocjene	praćenje genetskih populacijskih parametara; potvrda roditeljstva	
2.	Jarice prijavljene za daljnji uzgoj u matičnim stadiма	tkivo	u trenutku komisjske ocjene, tj. pri dodjeli matičnog broja	praćenje genetskih populacijskih parametara; potvrda roditeljstva	
3.	Koze za daljnji uzgoj u matičnim stadiма	tkivo rezidual na DNK	prilikom boravka na gospodarstvu	genomsko vrednovanje, praćenje genetskih populacijskih parametara	

Tablica 8. Prikaz vrste i broja bioloških uzoraka prema kategoriji **istarске koze**

RB	Kategorije	Vrsta uzorka	Broj uzoraka
1.	Mladi jarčevi/jarčevi Jarice/koze	tkivo	

4. PROTOKOLI ZA SAKUPLJANJE I POHRANU BIOLOŠKOG MATERIJALA

4.1 DLAKA

Procedura prikupljanja bioloških uzoraka dlake istarskog magarca za potrebe IBAG obuhvaća uzorkovanje, manipulaciju i pohranu uzoraka istog. Procedura se odnosi na prikupljanje uzoraka dlake uzgojno valjanih matičnih grla kroz godinu prilikom obilježavanja grla istarskog magarca. Uzorkovanje se provodi i ciljano od određenih grla/stada kada to nije sastavni dio označavanja kopitara sukladno navedenoj Proceduri.

Dlaka (griva) kao biološki uzorak

- Dlaka kao biološki materijal prikuplja se sa ciljem pohrane uzoraka uzgojno valjanih jedinki istarskog magarca, provođenje testiranja očinstva i uspostave baze registriranih DNK tipova.
- Korijen dlake (folikul) sadrži deoksiribonukleinsku kiseline (DNK) stoga za potrebe uzorkovanja dlaku treba čupati s korijenom za dobivanje kvalitetnije DNK.

Uzorkovanje dlake (grive) kopitara

- Postupak uzorkovanja: Tanji snop dlaka grive treba uzeti u šaku i povući trzajem (Slika 1). Važno je da na dnu uzorkovane dlake ostane korijen dlake s folikulom. Preporuča se dlaku grive uzorkovati s više mjesta duž vratne linije i iz središta grive (nalaze se dlake s najjačim folikulima).
- Uzorkovanje dlake ne smije provoditi njenim šišanjem (korištenje škara).
- Radi duže dugotrajnosti uzorkovanog materijala preporuča se da griva bude suha i bez mehaničkih nečistoća (blato, grančice,..).
- Sigurnost pri uzorkovanju: Pravilno provedeno uzorkovanje grive kopitara ne bi trebalo biti negativno iskustvo za jedinku, no može se dogoditi da jedinka bude nemirna zbog nepoznate situacije i okruženja. Preporuča se da vlasnik bude u neposrednoj blizini grla kako bi ga smirio, da djelatnik koji provodi uzorkovanje prati znakove konja (položaj ušiju), a u krajnjoj nuždi može se primijeniti uzorkovanje u stojnici.



Slika 1. Uzorkovanje dlake (grive) kopitara

Veličina uzorka dlake (grive) kopitara

- Preporuča se sakupiti 80-100 folikula dlake (grive) po grlu (Slika 2).



Slika 2. Uzorkovanje dlake (grive) kopitara

Pohrana uzorka dlake iz grive

- Nakon uzorkovanja, dlaka se spremi u vrećicu s automatskim zatvaračem i naljepnicom na koju se upisuju svi potrebni podaci grla (Slika 3.).
- Podaci se prvo ispisuju na naljepnicu koja se lijepli na praznu vrećicu ina kraju se u vrećicu stavlja uzorak (dlaka ne smije viriti iz vrećice).
- Uzorak grive poželjno je zavezati ili omotati oko njega samog i staviti ga u vrećicu (Slika 2.).
- Zatvarač na vrećici treba djelomično zatvoriti (do 1 cm otvor) i ostaviti mali otvor za zrak kako bi se korijen dlake mogao osušiti na sobnoj temperaturi između 24-48 sati. Ukoliko bi se vrećica zatvorila odmah po uzorkovanju, korijen dlake se ne bi osušio već bi istrunuo, čime se smanjuje kvaliteta uzorka za genetske analize. Nakon što se uzorak osušio, patent na vrećici treba zatvoriti do kraja.
- Pohrana do transporta je na sobnoj temperaturi u prostoru bez vlage.

Specifikacija uzorka dlake				
Biološki uzorak dlaka				
Vrsta	Pasmina	ŽB	Uzgajivač	Datum uzorkovanja

Slika 3. Naljepnica za pohranu i transport dlake

Specifikacija uzorka dlake (grive)

- Uzorkovani materijal (dlaka) u transportu prati obrazac Specifikacije koji se sastoji se od dvije stranice.
- Prva stranica obrasca Specifikacije sadrži opće podatke: redni broj uzorka (RB uzorka), vrstu, pasminu i jedinstveni životni broj grla (UELN ili ŽB; Slika 4.).
- Druga stranica Specifikacije sadrži „Popratnicu bioloških uzoraka dlake“ s podatcima o prikupljanju i preuzimanju uzorkovanog materijala (Slika 4.).
- Obrazac Specifikacije uzorka dlake (grive) na raspolaganju je djelatnicima AZRRI-ja i Hrvatske agencije za poljoprivrodu i hranu (HAPIH) iz Područnog ureda iz Pazina.
- Prilikom transporta odgovorna osoba unosi datum prikupljanja i transporta uzorka.
- Kada se uzorci dopreme u IBAG, odgovorna osoba koja je zaprimila uzorke u „Popratnicu bioloških uzoraka dlake“ ručno upisuje datum zaprimanja te ime i prezime.

 Specifikacija uzorka dlake (grive)	 Popratnica bioloških uzoraka dlake (grive)																																																																																																																																								
<table border="1"><thead><tr><th>Rb</th><th>Vrsta</th><th>Pasmina</th><th>UELN / ŽB</th></tr></thead><tbody><tr><td>1.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>2.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>3.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>4.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>5.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>6.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>7.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>8.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>9.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>10.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>11.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>12.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>13.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>14.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>15.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>16.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>17.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>18.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>19.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>20.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>21.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>22.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>23.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>24.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>25.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>26.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>27.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>28.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>29.</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>30.</td><td></td><td></td><td></td></tr></tbody></table>	Rb	Vrsta	Pasmina	UELN / ŽB	1.				2.				3.				4.				5.				6.				7.				8.				9.				10.				11.				12.				13.				14.				15.				16.				17.				18.				19.				20.				21.				22.				23.				24.				25.				26.				27.				28.				29.				30.				<table border="1"><thead><tr><th>Podatke upisuje</th><th>Aktivnost</th><th>Datum</th><th>Odgovorna osoba</th></tr></thead><tbody><tr><td>Odgovorna osoba</td><td>Prikupljajem uzorka Održavam uzorka</td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td>Datum zaprimanja uzorka u IBAG</td><td></td><td></td></tr></tbody></table>	Podatke upisuje	Aktivnost	Datum	Odgovorna osoba	Odgovorna osoba	Prikupljajem uzorka Održavam uzorka				Datum zaprimanja uzorka u IBAG		
Rb	Vrsta	Pasmina	UELN / ŽB																																																																																																																																						
1.																																																																																																																																									
2.																																																																																																																																									
3.																																																																																																																																									
4.																																																																																																																																									
5.																																																																																																																																									
6.																																																																																																																																									
7.																																																																																																																																									
8.																																																																																																																																									
9.																																																																																																																																									
10.																																																																																																																																									
11.																																																																																																																																									
12.																																																																																																																																									
13.																																																																																																																																									
14.																																																																																																																																									
15.																																																																																																																																									
16.																																																																																																																																									
17.																																																																																																																																									
18.																																																																																																																																									
19.																																																																																																																																									
20.																																																																																																																																									
21.																																																																																																																																									
22.																																																																																																																																									
23.																																																																																																																																									
24.																																																																																																																																									
25.																																																																																																																																									
26.																																																																																																																																									
27.																																																																																																																																									
28.																																																																																																																																									
29.																																																																																																																																									
30.																																																																																																																																									
Podatke upisuje	Aktivnost	Datum	Odgovorna osoba																																																																																																																																						
Odgovorna osoba	Prikupljajem uzorka Održavam uzorka																																																																																																																																								
	Datum zaprimanja uzorka u IBAG																																																																																																																																								
Stranica 1 od 2	Stranica 2 od 2																																																																																																																																								

Slika 4. Transport uzorka dlake (grive)

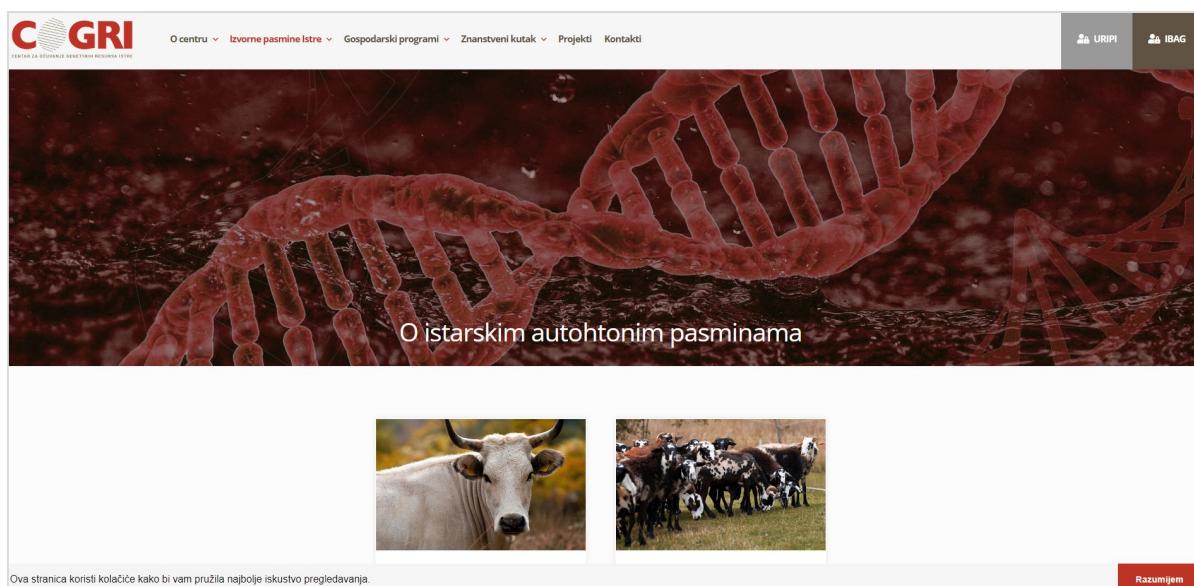
Transport uzorka dlake (grive)

- Transport uzorkovanog materijala se odvija sukladno dogovorno između djelatnika AZRRI i Područnog ureda HAPIH-a u Pazinu.
- Transport uzorka se provodi pri terenskom radu.

Manipulacija i pohrana uzorka u IBAG

- IBAG u kojoj se provodi postupak pripreme za pohranu i trajna pohrana nalazi se na lokaciji AZRRI – Gortanov briješ u Pazinu.
- Nakon zaprimanja uzorka, ispunjavanja datuma i potpisa odgovorne osobe u IBAG u obrazac Specifikacije uzorka dlake (str. 2., Popratnica bioloških uzoraka dlake (grive)), obrazac se pohranjuje u arhivu razvrstanu prema vrsti domaćih životinja.
- U IBAG vodi se interna evidencija o broju zaprimljenih uzoraka po pasmini.
- IBAG ima izravan pristup središnjim bazama Ministarstva poljoprivrede u kojima se nalaze podaci o uzgojno valjanim grlima.

- Svako uzorkovano grlo pronalazi se u središnjoj bazi podataka uzgojno valjanih grla.
- U slučaju nejasnoća ili nedostupnosti podataka, IBAG kontaktira za sve informacije Ministarstvo poljoprivrede.
- Podaci svakog uzorkovanog grla unose se u software COGRI (Centar za očuvanje genetskih resursa Istre; Slika 5.) koji se nalazi na internet stranici AZRRI na adresi: <https://cogri.azrri.hr/hr/o-centru/>. COGRI predstavlja centralnu bazu podataka cjelokupne IBAG.
- Djelatnik IBAG dobiva korisničko ime i lozinku za ulazak u software COGRI, a ista osoba odgovorna je za vjerodostojnost unosa podataka grla čiji biološki materijal se pohranjuje u IBAG.
- Nakon unosa podataka u COGRI, za vrećicu s biološkim uzorkom spaja se primjerak rodovnika (klamericom) i uzorak se pohranjuje u Zbirku IBAG.



Slika 5. Centar za očuvanje genetskih resursa Istre (COGRI) – središnja baza podataka Istarske Banke gena (IBAG)

4.2 UŠNO TKIVO

Uzorkovanje ušnog tkiva kao biološkog uzorka korištenjem kivete (*eng. tissue sampling unit*, TSU) prikazano je na slici 6.. Naveden tip uzorkovanja provodi se kod slijedećih kategorija:

- **Izvorne pasmine goveda** – uzorkuje se sva oteljena telad prilikom označavanja ušnom markicom,
- **Izvorne pasmine ovaca** – uzorkuju se svi aktivni ovnovi u matičnim stadima, svaki mladi novoodabrani ovan prilikom označavanja markicom i bolusom, ovce i šilježice,
- **Izvorne pasmine koza** – uzorkuju se odabrani jarčevi u matičnim stadima, svaki mladi novoodabrani jarac prilikom označavanja markicom i bolusom, koze i jarice.

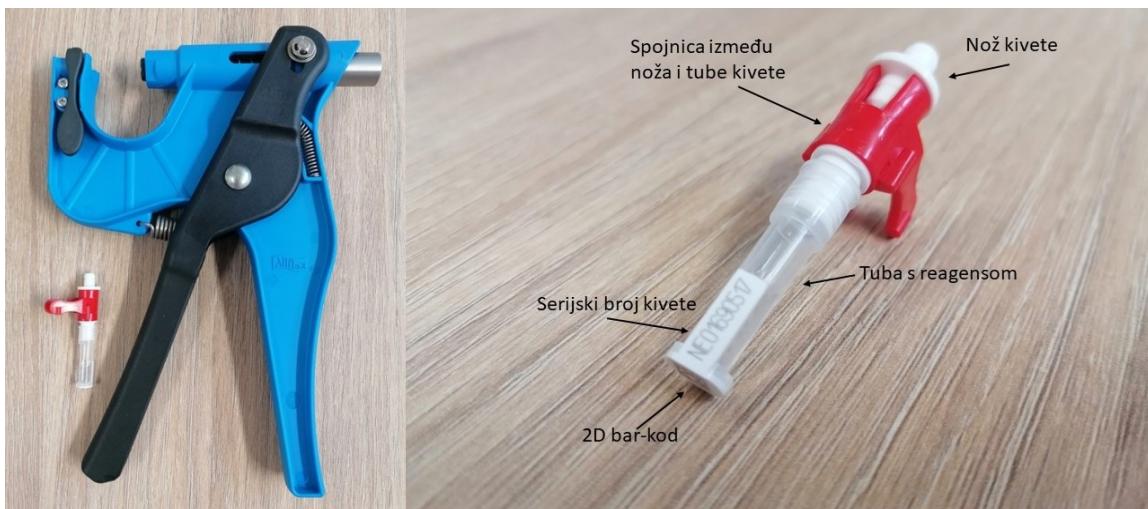


Slika 6. Primjer uzorkovanja ušnog tkiva korištenjem klješta i kivete

Za uzimanje uzorka ušnog tkiva koriste se specijalna klješta i kivete s reagensom u svrhu dužeg čuvanja uzorka od kvarenja. Metoda se zasniva na brzom i jednostavnom prikupljanju DNK isijecanjem malog uzorka tkiva na ušnoj školjci grla. Kvaliteta i veličina biološkog uzorka uzetog kivetom osigurava dovoljnu količinu DNK materijala za genotipizaciju, testiranje porijekla (roditeljstva), utvrđivanje genetskih defekata i specifičnosti kao i dijagnozu bolesti. Ergonomsko dizajnirana klješta omogućuju brzo stavljanje kivete i uzorkovanje u različitim vremenskim uvjetima. Kiveta je prozirna što omogućava sigurnu informaciju da je uzorak uzet, malog je volumena što smanjuje troškove potrošnje reagensa za čuvanje uzorka i na sebi sadrži jedinstveni 2D bar-kod koji omogućava potpunu povezanost identifikacijskog broja (ID) životinje u svakom trenutku manipulacije i transporta. Druge prednosti uzorkovanja korištenjem kiveta je brzina postupka, nemogućnost kontaminacije uzorkovanog materijala, dugotrajnost uzorkovanog tkiva, kratak boravak osobe koja uzorkuje uz grlo (promatrano s aspekta sigurnosti) i lagan transport.

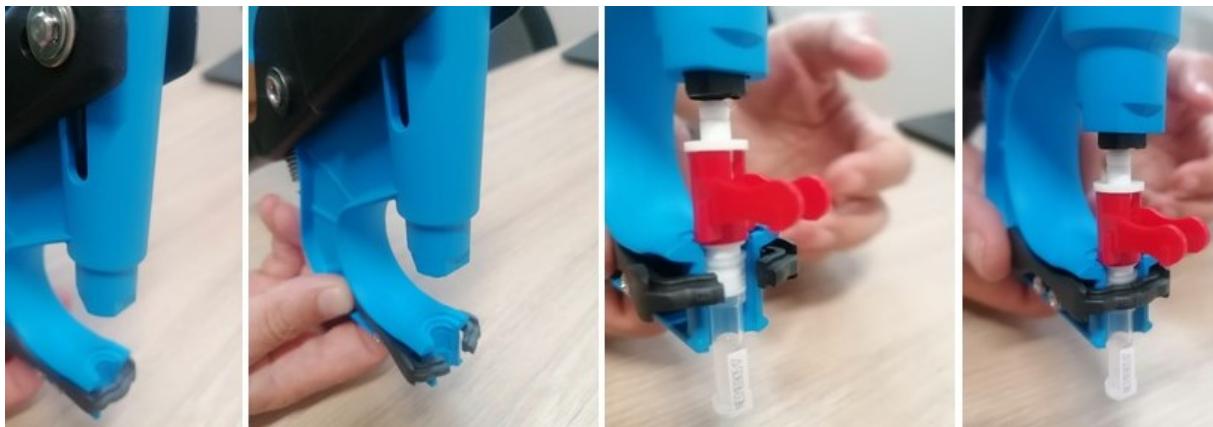
Oprema za uzorkovanje tkiva korištenjem klješta i kivete

Izgled klješta i kivete za uzorkovanje ušnog tkiva prikazani su slikom 7.



Slika 7. Klješta i kivete za uzorkovanje bioloških uzoraka ušnog tkiva

Priprema kliješta i kivete za uzorkovanje i uzorkovanje



Otvaranje sigurnosnog prstena (kao kliješta).

Stavljanje kivete u ležište.

Zatvaranje sigurnosnog prstena.



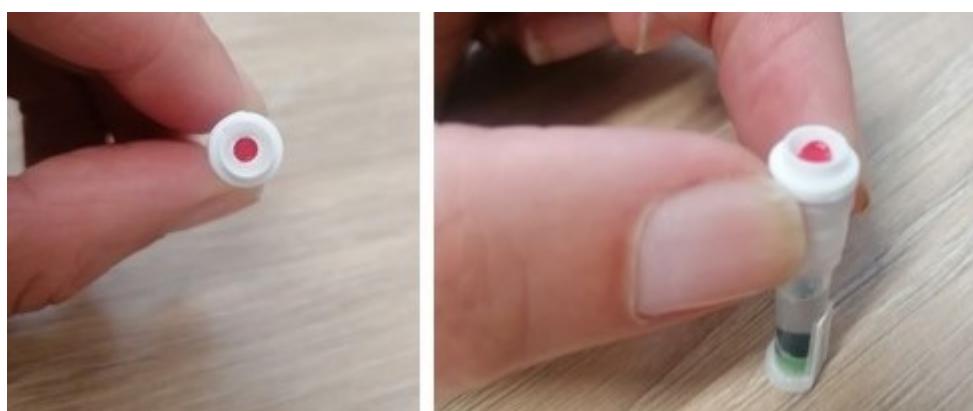
Stisnuti kliješta da se igla iz kivete fiksira u kliještimu.

Ukloniti zaštitni (crveni) dio s kivete.

Izvršiti uzorkovanje tkiva.

Izbaciti iglu pomicanjem crne ručice kliješta prema naprijed. Iskorištena igla se bacaj.

Slika 8. Priprema za uzorkovanje i uzorkovanje ušnog tkiva



Crvena oznaka na vrhu kivete, zelena loptica i tkivo u reagensu znak su da je uzorkovanje bilo uspješno.

Slika 9. Indikatori uspješnog uzorkovanja ušnog tkiva

Napomena:

- Kliješta mogu imati različit tip sigurnosnog prstena (u obliku cilindra ili kliješta), no princip rada je identičan.
- Igra je vrlo oštra i treba paziti pri rukovanju.
- Nakon uzorkovanja kliješta treba očistiti od nečistoća vlažnim maramicom, preporuča se prebrisati kliješta alkoholom te spremiti u suhu vrećicu u suhu prostoriju. Periodično je poželjno metalne dijelove kliješta premazati uljem.

Označavanje kivete s biološkim uzorkom

Kivete su tvornički označene serijskim brojem i bar-kodom na dnu tube (Slika 10.). Ideničan bar-kod i serijski broj nalaze se na naljepnici zalijepljenoj vrećici s hermetičkim zatvaračem u koji se stavlja kiveta s uzorkom ušnog tkiva. Na naljepnici nalaze se slijedeće informacije koje je potrebno ispisati:

- DATE: upisuje se datum uzorkovanja (i po mogućnosti mjesto)
- N° ANIMAL/ANIMAL ID: upisuje se jedinstveni životni broj grla
- N° CHEPTEL/HERD OR FARM NUMBER: upisuje se prezime uzgajivača



Slika 10. Izgled vrećice za spremanje kivete s potrebnim podacima

Privremena pohrana i transport uzorka tkiva

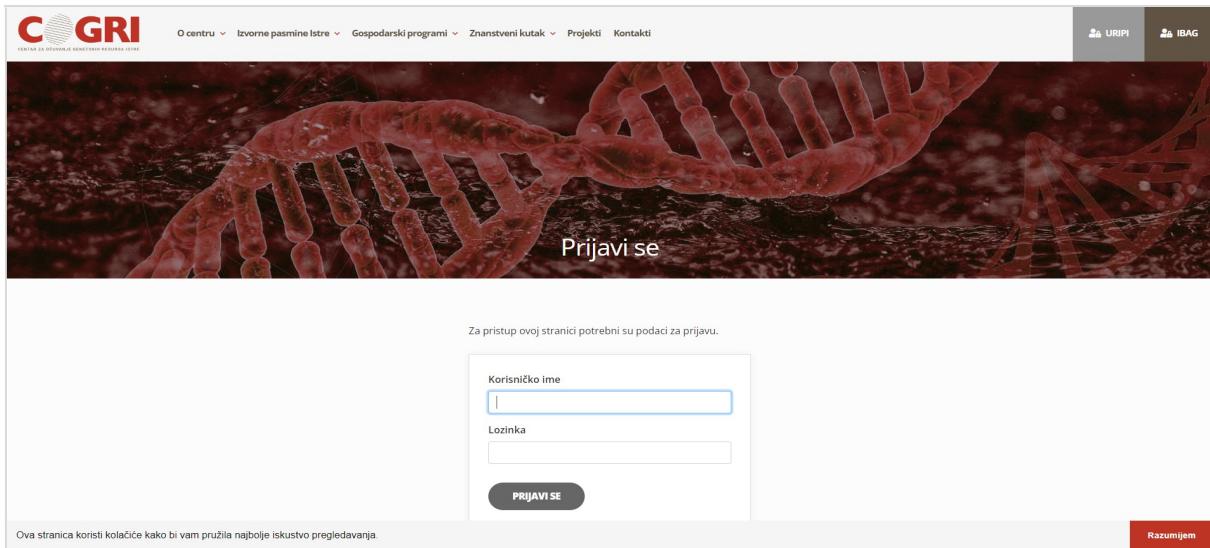
- Vrećice s kivetom (i uzetim uzorkom) treba privremeno uskladištiti na tamnom i hladnjem mjestu (hladnjak, zamrzivač) do otpremanja.
- Za vrijeme transporta pošiljku kiveta prati obrazac Specifikacije uzoraka tkiva i to na način da su specifikacije zasebne prema vrsti domaće životinje (goveda, ovce i koze; Slika 4.; Slika 11.).
- Obrazac Specifikacije uzoraka tkiva sastoji se od dvije stranice: prve s informacijama o uzorkovanom materijalu (redni broj, vrsta, pasmina, životni broj jedinke) i „Popratnice bioloških uzoraka tkiva“ (informacije o datumu uzorkovanja i zaprimanja).
- Prilikom transporta odgovorna osoba unosi datum prikupljanja i transporta uzorka.
- Kada se uzorci dopreme u IBAG, odgovorna osoba koja je zaprimila uzorke u „Popratnicu bioloških uzoraka tkiva“ ručno upisuje datum zaprimanja te ime i prezime.

  Obrazac IBAG 2000	  Obrazac IBAG 2000																																																																																																																																								
Specifikacija uzoraka tkiva <table border="1"> <thead> <tr> <th>Rb</th> <th>Vrsta</th> <th>Pasmina</th> <th>ŽB</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>2</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>13</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>14</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>15</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>16</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>17</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>18</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>19</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>20</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>21</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>22</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>23</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>24</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>25</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>26</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>27</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>28</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>29</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>30</td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>	Rb	Vrsta	Pasmina	ŽB	1				2				3				4				5				6				7				8				9				10				11				12				13				14				15				16				17				18				19				20				21				22				23				24				25				26				27				28				29				30				Popratnica bioloških uzoraka tkiva <table border="1"> <thead> <tr> <th>Podatke upisuje</th> <th>Aktivnost</th> <th>Datum</th> <th>Odgovorna osoba</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Odgovorna osoba</td> <td>Prikupljanje uzorka... Dostava uzorka</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Banka gena</td> <td>Datum zaprimanja uzorka u IBAG</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Podatke upisuje	Aktivnost	Datum	Odgovorna osoba	Odgovorna osoba	Prikupljanje uzorka... Dostava uzorka			Banka gena	Datum zaprimanja uzorka u IBAG		
Rb	Vrsta	Pasmina	ŽB																																																																																																																																						
1																																																																																																																																									
2																																																																																																																																									
3																																																																																																																																									
4																																																																																																																																									
5																																																																																																																																									
6																																																																																																																																									
7																																																																																																																																									
8																																																																																																																																									
9																																																																																																																																									
10																																																																																																																																									
11																																																																																																																																									
12																																																																																																																																									
13																																																																																																																																									
14																																																																																																																																									
15																																																																																																																																									
16																																																																																																																																									
17																																																																																																																																									
18																																																																																																																																									
19																																																																																																																																									
20																																																																																																																																									
21																																																																																																																																									
22																																																																																																																																									
23																																																																																																																																									
24																																																																																																																																									
25																																																																																																																																									
26																																																																																																																																									
27																																																																																																																																									
28																																																																																																																																									
29																																																																																																																																									
30																																																																																																																																									
Podatke upisuje	Aktivnost	Datum	Odgovorna osoba																																																																																																																																						
Odgovorna osoba	Prikupljanje uzorka... Dostava uzorka																																																																																																																																								
Banka gena	Datum zaprimanja uzorka u IBAG																																																																																																																																								

Slika 11. Obrazac specifikacije uzoraka tkiva

Manipulacija i pohrana uzoraka u banchi gena

- IBAG se svojim materijalnim djelom u kojem se provodi manipulacija pripreme za pohranu i trajna pohrana nalazi se na lokaciji AZRRI – Gortanov brije, Pazin.
- Nakon zaprimanja uzorka i ispunjavanja datuma i potpisa odgovorne osobe u IBAG u obrazac specifikacije, obrazac specifikacije se pohranjuje u arhivu razvrstanu prema vrsti domaćih životinja.
- U IBAG vodi se interna evidencija o broju zaprimljenih uzoraka prema pasmini.
- IBAG ima izravan pristup središnjim bazama Ministarstva poljoprivrede u kojima se nalaze podaci o uzgojno valjanim grlima domaćih životinja.
- Podaci svakog uzorkovanog grla unose se u software COGRI (Slika 5., Slika 12.) kao centralnu bazu podataka cjelokupne IBAG, a koji se nalazi na Internet stranici AZRRI na adresi: <https://cogri.azrri.hr/hr/o-centru/>.
- Djelatnik IBAG ima korisničko ime i lozinku za ulazak u software COGRI, a ista osoba odgovorna je za vjerodostojnost unosa podataka grla čiji biološki materijal se pohranjuje u IBAG
- Uzorci tkiva u kivetama se pohranjuju u kontejnere s tekućim dušikom na -195 °C.



Slika 12. Prijava u Centar za očuvanje genetskih resursa Istre (COGRI)

4.3 KRV

- Krv se uzima iz krvnih žila u epruvete ili na FTA kartice (eng. Flinders Technology Associates)
- Epruvete su volumena od 2 mL u kojima je antikoagulans EDTA (Etilendiamintetraoctena kiselina). Epruveta je zatvorena s ljubičastim čepom.
- Preporuča se uzeti oko 2 mL krvi. Nakon uzimanja važno je laganim pokretima izmiješati krv i antikoagulans u epruveti.
- Prikupljeni uzorci mogu se:
 - i) u roku 24 sata poslati u analitički laboratorij,
 - ii) pohraniti u hladnjaku do 7 dana,
 - iii) zamrznuti u zamrzivaču.
- Uzorkovanje provode za postupak ovlaštene osobe

5. POHRANA GENETSKOG MATERIJALA

Sakupljeni genetski materijal pohranjuje se u IBAG sukladno navedenim protokolima (Protokoli za sakupljanje i pohranu biološkog materijala). IBAG zajedno s Uzgojnim registrom izvornih pasmina Istre (URIPI) čini glavnu sastavnicu COGRI-a. Specifikacija genetskog materijala nalazi se u IBAG u sklopu koje se provodi i sistematizacija izvornih pasmina sa ciljem planskog vođenja uzgoja u cilju očuvanja pa i povećanja genetske varijabilnosti te izbjegavanja štetnih utjecaja uzgoja u srodstvu (*inbreedinga*). Podatci o rodoslovju (pedigre) i proizvodni podatci jedinki nalaze se u URIPI. Stoga je COGRI jedinstvena platforma koja objedinjuje sve relevantne uzgojne i genetske podatke o istarskim izvornim pasminama (istarskom govedu, istarskom magarcu, istarskoj ovci i istarskoj kozi). Dokumentacija zbirki genetskog materijala u COGRI sadržava osnovne podatke o životinjama donorima, strukturu skladišta, opis pohranjenih uzoraka i njihovu distribuciju unutar IBAG.

5.1 Praćenje brojnog stanja uzoraka

Za učinkovitu provedbu zaštite i očuvanja izvornih pasminama nužno je pratiti brojno stanje pohranjenog genetskog materijala.

Tablica 9. Ukupan broj uzoraka po vrsti životinja i tipu tkiva

Vrsta	Dlaka	Krv	Tkivo	Ukupno	%
Goveda					
Koze					
Ovce					
Magarci					
Ukupno					
%					

Tablica 10. Ukupan broj uzoraka po vrstama domaćih životinja, tipu tkiva i godini uzimanja uzoraka

Vrsta	Tip tkiva	2020	2021	2022	2023	Ukupno
Goveda	Dlaka					
	Krv					
	Tkivo					
Koze	Dlaka					
	Tkivo					
Ovce	Dlaka					
	Tkivo					
Magarci	Dlaka					
	Tkivo					
Ukupno						
%						

5.2 Tehnički uvjeti za čuvanje uzoraka biološkog materijala

Za rad lokalne BAG potrebna je uredska prostorija, te skladišni prostor s pripadajućom opremom. Potrebna dokumentacija (upute, obrasci) za terensko prikupljanje somatskih tkiva (dlaka, tkivo, krv) je razrađena. U skladišnom prostoru smješteni su zamrzivači u kojima se čuva prikupljeni biološki materijal. U navedenom prostoru mogu biti smješteni i metalni ormari za čuvanje dlake na sobnoj temperaturi. Za skladištenje tkiva u tekućem dušiku služe spremnici različitih zapremina.

Evidencija uzorka

Popis svih bioloških uzoraka vodi se u excel tablici i internom programu (software) u kojeg se upisuju podatci, pretražuju uzorci i pripremaju različita izvješća. Prema dostupnim istraživanjima i mišljenjima kuratora zbirk animalnih gena, dlaka se u pravilu koristi neposredno nakon uzimanja uzorka za ekstrakciju DNK i genotipizaciju jedinki. Ovisno o veličini dlačnog folikula, ovisi i broj dlaka koji će biti dostatan za uzorkovanje. Tako je npr. kod kopitara dovoljno 30-40 dlaka s folikulima, dok je za ekstrakciju DNK iz dlake koza potrebno 100-150 folikula. Uzorkovana tkiva, ukoliko postoji mogućnost, poželjno je pohraniti u manjim količinama u više replika na najmanje -80°C. Važno je znati da da skladištenjem propada dio DNK, neovisno o vrsti genetskog materijala i načinu skladištenja (Shema 1.).

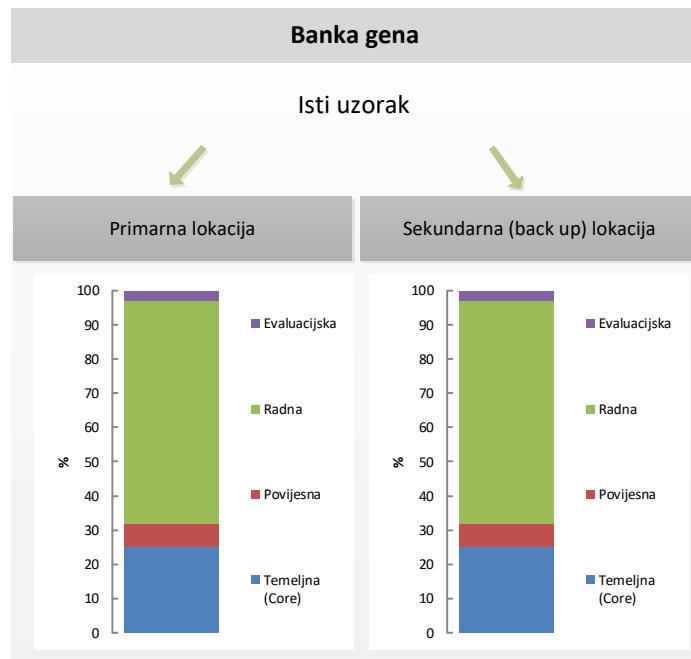
Bolja kvaliteta i veća količina DNK	
Vrsta uzorka	Način skladištenja
Krv	Na -80°C
Somatska tkiva	Izolacija DNK odmah po uzorkovanju
Dlaka s većim folikulima i više dlake	Čuvanje na suhom uz korištenje silika-gela
Dlaka s manjim folikulima i manje dlake	Izlaganje suncu, vlazi
Loša kvaliteta i mala količina DNK	
	Zamrzavanje / odmrzavanje

Shema 1. Prikaz djelovanja vrste uzorka i načina skladištenja na kvalitetu izolirane DNK

Tehnički aspekti rada banke gena

Tijekom uzorkovanja treba se uzeti od svake jedinke po dva uzorka (duplicat) koji se potom čuva na dvije lokacije koje trebaju raspolagati identičnom opremom za čuvanje uzoraka i u svrhu čuvanja trebaju biti primjenjivani isti postupci. Jedan uzorak deponira se u temeljnu (primarnu) kolekciju (*eng. core collection*), a drugi uzorak u sekundarnu kolekciju (tzv. *back-up*). Dio uzoraka regionalnih izvornih pasmina domaćih životinja bio bi pohranjen u Banku gena domaćih životinja Republike Hrvatske u Poljani Križevačkoj koja predstavlja

središnju točku nacionalne mreže banke gena. Drugi uzorak pohranjuje se u priznatu Banku gena, odnosno IBAG u Pazinu.



Shema 2. Kolekcija genetskog materijala dijeli se na temeljnju (*core collection*), povijesnu, radnu i evaluacijsku

Temeljna (*core collection*) kolekcija predstavlja osnovni dio banke gena ($\approx 25\%$) te pristup ovoj kolekciji u pravilu nije moguć. Koristi se isključivo u kritičnim situacijama (rekonstrukcija izumrle pasmine, povećanje varijabilnosti neke populacije, uklanjanje nepoželjne mutacije i dr.). Temeljna kolekcija trebala bi sadržavati najmanje 150% potrebne količine germinativnih tkiva (sperma, jajne stanice, embriji) potrebnih za rekonstrukciju pasmine. U apsolutnim vrijednostima ovisi o vrsti životinja.

Uspostavljenje povijesne kolekcije Banke gena ($\approx 7\%$) nije obligatorno, odnosno, može se, ali i ne mora uspostaviti. Budući da se populacija očuvanjem *in situ* metodom mijenja tijekom vremena, potrebno je revitalizirati temeljnu kolekciju Banke gena sukladno promjenama. Uzorci koji se uklanjuju iz temeljne kolekcije i zamjenjuju novim, mogu se proglašiti povijesnima i kao takvi koristiti. Povijesna kolekcija može koristiti u istraživanjima.

Radna kolekcija je najdinamičniji dio banke gena ($\approx 65\%$) i koristi se svrhu provedbe uzgojnih programa i za potrebe istraživanja.

Evaluacijska kolekcija ($\approx 3\%$) služi za provjeru uspješnosti postupka uzimanja i zamrzavanja tkiva, kao npr. kod izolacije DNK iz sperme. Evaluacija se treba provesti ubrzo nakon zamrzavanja i biti ponovljena ukoliko postoji bojazan da su uzorci na neki način kontaminirani. Za postupak evaluacije koristi se relativno mali broj uzoraka (npr. za spermu od dvije do deset pajeta). Evaluacijska kolekcija koristi se za provjeru prisutnosti patogena u zamrznutom uzorkovanom materijalu.

Sigurnost

Prostorije Banke gena u kojima se nalaze spremnici s tekućim dušikom trebaju udovoljavati uvjetima sigurnosti i sadržavati:

- Zaštitnu opremu za sigurno rukovanje (zaštitne rukavice, zaštitnu odjeću, zaštitne cipele, naočale),
- Sprječavanje nastanka hipoksije (ugraditi vrata koja dobro zatvaraju prostoriju, imati odgovarajuću ventilaciju u prostoriji (ventilatori i ventilacijski otvori trebaju biti postavljeni nisko u blizini poda jer su dušične pare teže od zraka te uz strop kako bi se osiguralo kruženje zraka), ugrađene mjerače i senzore za kisik s alarmom, kontrolne liste i drugo).
- Vremenski hodogram dopunjavanja tankova tekućim dušikom (treba omogućiti jednostavno i sigurno rukovanje opremom pri dopunjavanju tankova),
- Osigurati sigurne uvjete u vozilu za vrijeme prijevoza uzoraka s terena do Banke gena (adekvatni spremnici, hladnjaci i drugo).

Sanitarni uvjeti

Poštivanje sanitarnih propisa tijekom uzorkovanja odnose se i na životinje i objekte u kojima se uzorkovanje provodi, što može utjecati na prikladnost uzoraka za pohranu u Banku gena. Sanitarni propisi (uvjeti) se mogu razlikovati između država te ovise i o nacionalnom zakonodavstvu prema čijim propisima Banke gena trebaju djelovati. Donesenim preporukama (nacionalni i globalni nivo) reguliraju se sanitarni aspekti sakupljanja, obrade, transporta i skladištenja germinativnih tkiva. Sanitarni status uzoraka ključan je čimbenik sprječavanja rizika pojave kontaminacije u skladištu ili infekcije tijekom korištenja germinativnih tkiva.

- Zaseban spremnik s tekućim dušikom za svaku pasminu (germinativna tkiva (sperma, embriji, oocite) jedne vrste s istim sanitarnim statusom mogu se prevoziti u istom spremniku),
- Zaseban spremnik za EU certificirano sjeme, odnosno za ostalo sjeme,
- Uzorci s različitim sanitarnim statusom i/ili različitim vrsta moraju biti pohranjeni u zasebnim spremnicima, ali se mogu skladištiti u istoj prostoriji, pod uvjetom da su spremnici jasno označeni i da rashladno sredstvo ne može prelaziti iz jednog spremnika u drugi.

Pravni aspekti uzimanja germinativnih tkiva

- Definirati ugovore s vlasnicima životinja (prava vlasnika, prava INAG, međusobni odnosi i slično).

Praćenje uzorka

- Osigurati interni software za upis i praćenje uzorka prema drugim kriterijima.

Čuvanje izolirane DNK

- Kratkotrajno čuvanje (u tjednima) na +4°C u Tris-EDTA,

- Srednjeročno čuvanje (u mjesecima) na 80°C u Tris-EDTA,
- Dugoročno čuvanje (u godinama) na najmanje 80°C kao precipitat u etanolu,
- Dugoročno čuvanje (dekade) na najmanje -164°C ili u tekućem dušiku.

6. PLANOVI ZA BUDUĆNOST

Pored prikupljanja somatskih tkiva (krv, dlaka, usno tkivo) koji se koriste za karakterizaciju pasmine, planira se početak prikupljanja i deponiranje reprogenetskog materijala (sjeme, jajne stanice i embriji) koji predstavljaju osnovu za rekonstrukciju pasmine. Planira se nastavak genotipizacije jedinki izvornih pasmina pomoću SNP markera (*engl. Single nucleotide polymorphism*).

Uzgojna sistematizacija izvornih pasmina i vjerodostojnost rodovničkih podataka

Matična evidencija osnova je modernog konzervacijskog programa i očuvanja izvornih pasmina koja omogućava plansko vođenje uzgoja (planske pripuste) u cilju očuvanja genetske varijabilnosti, odnosno izbjegavanja štetnog uzgoja u srodstvu (inbreeding). Stoga je u cilju planskog vođenja uzgoja izvornih pasmina značajno nastaviti sistematizaciju rodovničkih podataka koji podrazumijeva definiranje linija muških i rodova ženskih jedinki kao osnovu planskog sparivanja. Do sada je provedena sistematizacija rodovničkih podataka istarskog goveda, a nedostaje sistematizacija uzgoja istarskog magarca. Pri odabiru modela sistematizacije treba uzeti u obzir vrstu i brojnu veličinu pasminske populacije (stupanj ugroženosti). Sistematiziran rodovnik temelj je planskog vođenja uzgoja i mjera kontrole izlučenja grla pri provedbi selekcijskih mjera te daje informaciju o genetskom značaju jedinke u populaciji koju treba obvezno uzeti u obzir prilikom odabira budućih rasplodnih grla, posebice muških.

Plansko vođenje uzgoja i dizajniranje uzgojnog programa

Obzirom da niti jedna populacija izvornih pasmina nije u potpunosti tipizirana molekularnim metodama za potrebe planskog uzgoja pasmine temeljem analiza na razini DNK strukture, u najkraćem roku i uz minimalan trošak moguće je postaviti plansko vođenje uzgoja temeljem rodovničkih podataka. Potrebno je izraditi sustav godišnjeg plana pripusta i vođenja uzgoja temeljem rodovničkih podataka u cilju očuvanja genetske varijabilnosti, odnosno izbjegavanja mogućnosti pojave štetnih inbreeding depresija. Nakon provedene sistematizacije uzgoja stvoreni su svi preduvjeti za dizajniranje kvalitetnog i dugoročnog uzgojnog programa.

Praćenje genetske varijabilnosti i potvrda roditeljstva na molekularnoj razini

Obzirom na relativno kratko vođenje pasminskih registara izvornih pasmina (mali broj poznatih generacija predaka) i vrlo često ekstenzivan sustav uzgoja izvornih pasmina, za vjerodostojnost planskog vođenja uzgoja važna je potvrda rodovničkih podataka na molekularnoj razini. Provedba potvrde roditeljstva, očinstva i majčinstva (*eng. paternity testing*) laboratorijskim analizama DNK strukture potvrđuje vjerodostojnost dokumenata matične evidencije koje dostavljaju uzgajivači u cilju upisa novorođenog grla u registar pasmine.

Povezivanje stručnih institucija u programima očuvanja

U provedbi programa očuvanja izvornih pasmina ključno je povezati institucije koje su dio programa, a to su: Ministarstvo poljoprivrede, državne stručne ustanove (HAPIH, AZRRI, APPRR¹), znanstvene institucije (fakulteti i instituti), uzgojna udruženja (savezi i udruge) te terenska veterinarska služba. Povezanost je važna pri kreiranju politika očuvanja izvornih pasmina do najniže operativne razine provedbe uzgojnih programa. Krovno tijelo za praćenje populacija izvornih pasmina domaćih životinja je Nacionalni savjet za provedbu programa očuvanja izvornih i zaštićenih pasmina domaćih životinja Republike Hrvatske, sastavljen od predstavnika stručnih i znanstvenih institucija te uzgajivača.

Kontrola izlučenja grla u cilju ekonomskog iskorištavanja

Jedna od najkritičnijih točaka provedbe uzgojnih programa je potencijalni izostanak kontrole izlučenja grla iz uzgoja. Pod time se ne podrazumijeva prodaja drugom vlasniku za daljnji uzgoj koja je poželjna, posebice ako se radi o novom uzgajivaču i novom matičnom stadi, nego izlučenje u svrhu ekonomskog iskorištavanja (klanje) ili izvoz. Nekontrolirano izlučenje sa ciljem ekonomskog iskorištenja (klanje ili izvoz) ima velike negativne posljedice na očuvanje genetske varijabilnosti populacije (pasmine), a počinjena šteta je u negativno pozitivnoj korelaciji s brojnim stanjem populacije. Rješenje je uvođenje sustava praćenja kontrole izlučenja te izrada modela odobrenja izlučenja grla za svaku izvornu pasminu i redovno utvrđivanje značaja svake novorođene jedinke nakon upisa u registar pasmine o njenom značaju u populaciji. Problem pri reguliranju izlučenja predstavlja vlasništvo nad grlima izvornih pasmina koje je neupitno, no obzirom da se na uzgoj izvornih pasmina ostvaruje pravo na državnu novčanu potporu, vlasnike grla treba obvezati temeljeno na nacionalnom interesu. Jednostavnije rečeno, stado izvorne pasmine može dugi niz godina ostvarivati znatna sredstva državne novčane potpore, a prestankom interesa vlasnik može sva grla izlučiti na ekonomsko iskorištenje. Tim činom godine ostvarenja novčane potpore državnog proračuna za očuvanje pasmine su izgubljena investicija državnih sredstava, ali i nepovratan i nemjerljiv gubitak genetskog nacionalnog bogatstva.

Redovito izyještavanje i praćenje populacija, te formiranje nukleus stada

Izvorne i zaštićene pasmine domaćih životinja potrebno je sustavno godišnje pratiti stupanj ugroženosti i efektivne vrijednosti odnosno broj životinja koje čine nukleus pasmine kao predmet trajne zaštite u pogledu očuvanja specifične genetske vrijednosti. Podaci o značaju jedinki temeljem molekularne informacije omogućavaju njihovo izdvajanje u nukleus pasmine čime je omogućeno očuvanje genetske varijabilnosti s znatno manjim brojem jedinki. Nukleus stada trebaju imati poseban tretman na nacionalnoj razini, a njihovo vođenje treba biti pod izravnom kontrolom stručnih i znanstvenih institucija. Odnose vlasnika nukleus jedinki ili stada također treba na nacionalnoj razini posebno tretirati i adekvatno financijski podržati. Formiranje nukleus stada omogućava sigurnije postavljanje programa gospodarske koristi i povećanje dohodovnosti uzgoja bez opasnosti po gubitak genetske varijabilnosti.

¹ APPRR - Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju

Programi gospodarske koristi

Problem očuvanja izvornih pasmina može se objasniti njihovom niskom produktivnosti. Međutim, izvorne pasmine postaju sve važniji resurs u iskorištavanju prirodnih potencijala u aktualnom globalnom ekonomskom i socijalnom okruženju. Programi gospodarske koristi postoje za istarsko govedo, dok se za ostale pasmine tek osmišljavaju i/ili provode. Uzgoj izvornih pasmina samo radi postojanja, bez gospodarske koristi, značajno otežava opstanak svake pasmine domaćih životinja, a posebice izvornih. U pojedinih izvornih pasmina, posebice goveda, moguće je osmišljavanje i programa gospodarske koristi u sustavu križanja s komercijalnim mesnim pasminama, ali pri izradi plana križanja treba kao glavni kriterij uzeti značaj jedinke (krave) u populaciji (nukleus).

7. EDUKACIJA I ISTRAŽIVAČKO RAZVOJNI DIO RADA ISTARSKE BANKE GENA

Uspostava i upravljanje IBAG iziskuje kontinuiranu edukaciju osoba koje je u neposrednom kontaktu s genetskim materijalom i osoba koji vodi dokumentacijsko-informacijski sustav. U edukaciju aktivno su uključene i osobe iz suradničkih institucija (npr. znanstvene, privatne) koje razvijaju protokole i metode. Iz godine u godinu vidljiv je tehnološki napredak bez kojega istraživačko-razvojni rad u cilju dizajniranja novih i poboljšanja postojećih protokola i metoda ne bio moguć, a što iziskuje određena finansijska sredstava. Stoga je za pravodobno odvijanje edukacije potrebno napraviti finansijsku konstrukciju koja će osigurati izdvajanje finansijskih sredstava, ovisno o raspoloživim finansijskim mogućnostima.

Plan edukacije i istraživačko razvojni dio rada IBAG

Osobe koje su u kontaktu s genetskim materijalom (priključivanje, transport i manipulacija uzorka), osobe zadužene za vođenje baze podataka, osobe koje razvijaju protokole, metode i sl. potrebno je educirati sukladno novim saznanjima. Kontinuirana edukacija osoba doprinijeti će stvaranju novih i poboljšanju postojećih protokola.

8. LITERATURA

1. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture (2010). Draft guidelines for the cryoconservation of animal genetic resources. Rome. <https://www.fao.org/3/am136e/am136e.pdf>.
2. Food and Agriculture Organisation (FAO) (2007). Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration. Rome. <https://www.fao.org/3/a1404e/a1404e.pdf>.
3. Food and Agriculture Organisation (FAO) (2012). Cryoconservation of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12. Rome.
4. Food and Agriculture Organisation (FAO) (2015). The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/fea3da3d-d6ed-4a27-8f58-2d83222b29d9/>.
5. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske (2021). Nacionalni program očuvanja izvornih i ugroženih pasmina domaćih životinja u Republici Hrvatskoj 2021.-2025. Zagreb. <https://stocarstvo.mps.hr/app/uploads/2021/12/nacionalni-program-izvornih-i-ugrozenih-pasmina-2021-2025-final.pdf>.