

Polimorfizam DGAT1 i TG gena u križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda

Kazić, Melinda

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:538072>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Polimorfizam DGAT1 i TG gena u križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda

DIPLOMSKI RAD

Melinda Kazić

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mesa

Polimorfizam DGAT1 i TG gena u križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda

DIPLOMSKI RAD

Melinda Kazić

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Jelena Ramljak

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Melinda Kazić**, JMBAG 0178105891, rođena 09.03.1997. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Polimorfizam *DGAT1* i *TG* gena u križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Melinde Kazić**, JMBAG 0178105891, naslova

Polimorfizam *DGAT1* i *TG* gena u križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|--------------------------------------|--------|-------|
| 1. | izv. prof. dr. sc. Jelena Ramljak | mentor | _____ |
| 2. | izv. prof. dr. sc. Miljenko Konjačić | član | _____ |
| 3. | prof. dr. sc. Krešimir Salajpal | član | _____ |

Zahvala

Hvala mentorici, izv. prof. dr. sc. Jeleni Ramljak, na stručnim savjetima, strpljenju i uloženom vremenu tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala i dr. sc. Valentinu Držaiću na profesionalnom vođenju stručne prakse koja je dio ovog diplomskog rada.

Također, htjela bih se zahvaliti svim profesorima i asistentima koji su nam u ovih pet godina studiranja pomagali oko savladavanja teoretskog i praktičnog dijela nastave.

I za kraj veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su bili tu kao potpora tijekom studiranja.

Rad posvećujem tetki Aidi koja više nije s nama, ali je živjela za ovaj trenutak, kao i za svaki moj položen ispit.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada.....	2
2. Pregled literature	3
2.1. Diacilglicerol O-aciltransferaza 1 (<i>DGAT1</i>)	3
2.2. Tiroglobulin	4
2.3. Pasmine goveda	6
2.3.1. Belgijsko plavo govedo.....	6
2.3.2. Holštajn govedo.....	7
3. MATERIJAL I METODE	12
3.1. Laboratorijske analize	12
3.1.1. Izolacija <i>DNK</i> iz tkiva	12
3.1.2. Lančana reakcija polimeraze.....	13
3.1.3. Genotipizacija.....	14
3.1.4. Statističke analize.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. Polimorfizam <i>DGAT1</i> i <i>TG</i> gena.....	16
4.2. Genetska struktura ispitivanog uzorka	19
5. ZAKLJUČAK	20
6. POPIS LITERATURE.....	21

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Melinde Kazić**, naslova

POLIMORFIZAM *DGAT1* I *TG* GENA U KRIŽANACA BELGIJSKOG PLAVOG I HOLŠTAJN GOVEDA

Selekcija u stočarskoj proizvodnji u novije vrijeme provodi na razini gena ili cijelog genoma koristeći različite genetske markere. Cilj ovog rada bio je utvrditi frekvenciju alela i genotipova, genetske parametre i te komparaciju dobivenih rezultata s rezultatima drugih istraživanjima za gene *DGAT1* (diacilglicerol O-acilotransferaza) i *TG* (tiroglobulin) na uzorku križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda. Geni *DGAT1* i *TG* navode se kao kandidat geni odgovorni za odlaganje intramuskularne masti i mramoriranosti u mesu goveda. Oba gena u ovom istraživanju bila su polimorfna s frekvencijama alela kako slijedi: *DGAT1* ($f(k) = 0,551, f(A) = 0,449$) i *TG* gen ($f(r) = 0,112, f(c) = 0,888$). Ukupno je utvrđeno pet genotipova, odnosno za *DGAT1* gen nije utvrđen genotip AA. Utvrđene frekvencija genotipova križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda na lokusu *DGAT1* značajno ($p < 0,01$) odstupaju od frekvencije genotipova populacije koja se nalazi u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, dok to nije bio slučaj za *TG* lokus. Dobiveni genetski parametri polimorfizma *DGAT1* i *TG* gena ovog istraživanja usporedivi su s rezultatima drugi znanstvenih istraživanja.

Ključne riječi: polimorfizam, *DGAT1*, *TG*, križanci belgijskog plavog i holštajn goveda

Summary

Of the master's thesis – student **Melinda Kazić**, entitled

POLIMORPHISM *DGAT1* AND *TG* GENES IN CROSSBREDS OF BELGIAN BLUE AND HOLSTEIN CATTLE

Recently, the selection in the livestock industry is based on the gene or the entire genome using different genetic markers. The goal of this thesis was to determine the frequency of alleles and genotypes, genetic parameters and results comparison of *DGAT1* (diacylglycerol-O-acyltransferase 1) and *TG* (thyroglobulin) genes on Belgian blue and Holstein cattle crossbreeds. The *DGAT1* and *TG* genes are expected to be responsible for intramuscular fat deposition and marbling of meat in cattle. In this research both genes were polymorphic with alleles frequencies as follows: *DGAT1* ($f(K) = 0,551$, $f(A) = 0,449$) i *TG* gene ($f(T) = 0,112$, $f(C) = 0,888$). Five genotype frequencies were determined, except AA genotype of *DGAT1* gene. Observed genotype frequencies Belgian blue and Holstein cattle crosses Furthermore, results showed that genotypes of Belgian Blue and Holstein cattle crossbreeds on *DGAT1* locus significantly deviate from genotype frequencies of population, which is in Hardy-Weinberg's equilibrium. On the other hand, *TG* locus did not show such deviation. In conclusion, genetic parameters of *DGAT1* and *TG* polymorphism from this research are comparable to results from other scientific researches.

Keywords: polymorphism, *DGAT1*, *TG*, crossbreeds of Belgian blue and Holstein cattle

1. Uvod

Selekcijski postupci provode se od davnina kad su eksterijerno bolje i proizvodnije jedinke ostavljane u stadima za daljnje razmnožavanje. U prošlosti je selekcija u govedarstvu uglavnom bila usmjerena na veću proizvodnju mlijeka i mesa na osnovi proizvodnih pokazatelja. Male genetske varijabilnosti stoljećima akumulirale u genomu životinja dovele su do vidljivih pozitivnih fenotipskih promjena, ali i ekspresije promjena s negativnim učinkom (npr. slabija adaptabilnost na okolišne čimbenike, slabija rezistentnost na antibiotike, itd.). Nastavak uzgojnog rada u selekciji goveda počeo se temeljiti na primjeni kvantitativne genetike, odnosno genetskom poboljšanju kvantitativnih svojstava. Iako je rad zahtjevan jer je vidljivost kvantitativnih svojstava uvjetovano mnoštvom gena, a na fenotipski učinak ima utjecaj i okolišna varijabilnost i heritabilitet, učinak selekcije nije izostao.

U novije vrijeme primjena molekularnih tehnologija ima sve veću primjenu u pronalasku i povezivanju proizvodnih podataka s genetskim informacijama. Koristeći različite markerske sustave znanstvenici otkrivaju nepoznanice u filogenetskim procesima iz prošlosti, služe za određivanje statusa ugroženosti populacija i pronalaze načine njihove zaštite za buduća vremena te mapiraju kandidat gena za određena svojstva. Uporaba molekularnih markera doprinijela je karakterizaciji osobina od interesa (npr. proizvodnost, otpornost na bolesti, adaptabilnost, itd.) koje su specifične za određene populacije. Tako npr. mutacije gena miostatina izazivaju hipertrofiju mišića stražnjeg dijela tijela kod goveda (O'Rourke i sur. 2013.) i ovaca (Clop i sur. 2006.) što je u direktnoj vezi s povećanom mesnatosti. Boorola gen kod nekih pasmina ovaca ima povoljno djelovanje na veličinu legla, odnosno broj ojanjene janjadi (Davis i sur. 2006.). Kandidat geni odgovorni za povećan udio intramuskularne masti i mramoriranost mesa koji doprinose njegovoj palatabilnosti su geni diacilglicerol O-aciltransferaza (*DGAT1*) i tiroglobulin (*TG*) geni.

Mnogo je primjera primjene molekularnih alata u pronalasku i pozicioniranju funkcionalnih varijacija unutar genoma različitih vrsta i pasmina životinja. Iako sustavna selekcija doprinosi bržem ostvarivanju selekcijskog napretka postižući zadani cilj u relativno kratkom vremenskom razdoblju, ona može imati negativan utjecaj na genetsku varijabilnost populacija. Naime, česta je pojava smanjene genetske raznolikosti unutar i između populacija kao rezultat smanjenje zastupljenosti ili čak gubitka određenih alelnih varijanti gena. Stoga svako provođenje uzgojnog rada i primjena selekcijskih postupaka treba biti pažljivo vođena koristeći sve raspoložive alate (npr. informacije pedigrea, fenotipske pokazatelje, genomske podatke).

1.1. Cilj rada

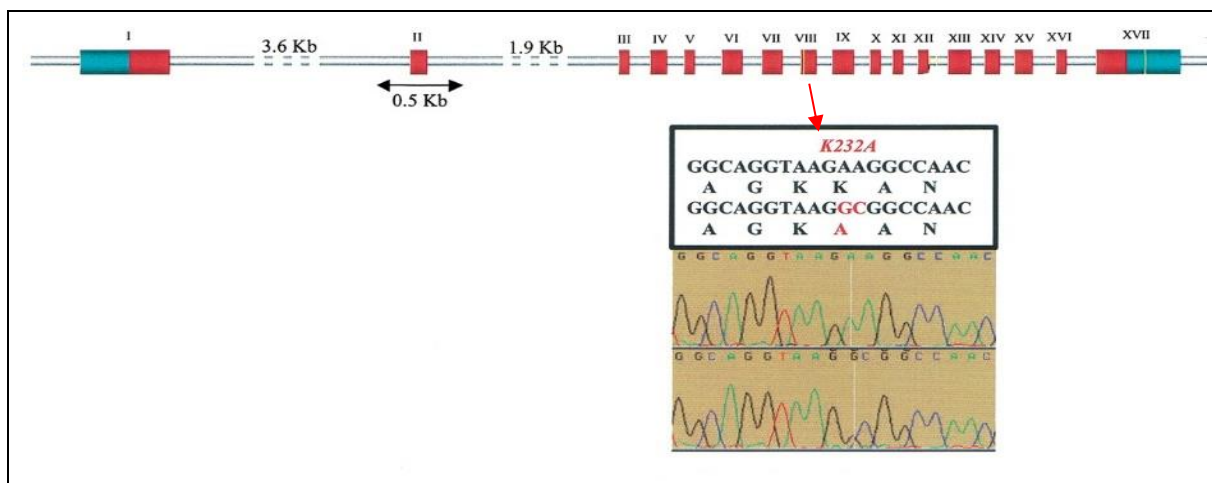
Cilj rada je u uzorku križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda utvrditi:

- a) frekvencije alela *DGAT1* i *TG* gena,
- b) frekvencije genotipova *DGAT1* i *TG* gena,
- c) da li utvrđene frekvencije genotipova *DGAT1* i *TG* gena značajno odstupaju od frekvencija genotipova u populaciji koja se nalazi u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži,
- d) dobivene genetske parametre usporediti s rezultatima drugih znanstvenih istraživanja.

2. Pregled literature

2.1. Diacilglicerol O-aciltransferaza 1 (*DGAT1*)

Gen diacilglicerol O-aciltransferaza 1 (*DGAT1*) nalazi se na 14. kromosomu goveda u centromernoj regiji (*Bos Taurus autosome, BTA14*) i kodira enzima diacilglicerol O-transferazu koji sudjeluje u biosintezi triacilglicerola. Gen je dužine 8,6 Kb i kodira 489 aminokiselina (Slika 2.1.. Sastoji se od 17 egzonskih regija prosječne veličine 121,8 bp (raspon od 42 do 436 bp) i 17 intronskih regija, od kojih su prve dvije regije velike i iznose 3,6 i 1,9 Kb, ostalih 14 regija je prosječne veličine 92,4 bp (raspon od 70 do 215 bp; Grisart i sur. 2002.).



Slika 2.1. Prikaz diacilglicerol O-aciltransferaza 1 (*DGAT1*) gena sa 17. egzonskih regija (crvena polja označena rimskim brojevima), intronskim regijama (označene sivom linijom i veličinom prve i druge intronske regije), a bočne regije zeleno su označene. Polimorfizam K232A prikazan je zamjenom dinukleotida AA/GC.

(Izvor: Prilagođeno prema Grisart i sur. 2002.)

Genom goveda sekvencioniran je 2009. godine (The Bovine HapMap Consortium, 2009.) te je ujedno sekvencioniran i *DGAT1* gen što je omogućilo pristup temeljitijem istraživanju djelovanja gena na procese u organizmu. Tako je kod različitih vrsta životinja utvrđena povezanost polimorfizma *DGAT1* gena sa sintezom i odlaganjem masti u organizmu, što se direktno odražava na proizvodne osobine kao npr. udio masti u mlijeku i mesu. Među prvim istraživanjima o utjecaju varijanti *DGAT1* gena na sadržaj mliječne masti ističe se istraživanje Winter i sur. (2002.) na mliječnim populacijama goveda iz Njemačke (German Fleckvieh, German Braunvieh, German Holstein–Friesian) kojim je utvrđeno 19 varijabilnih mjesta unutar gena. Na pozicijama 10433 i 10434 u egzonu 8 *DGAT1* gena prisutan je polimorfizam *GC/AA* koji uzrokuje promjenu aminokiseline lizin (*K*) u alanin (*A*) na poziciji 232 proteina koji se označava kraticom K232A. Smatra se da je aminokiselina lizin kodirajuća varijanta koja je prevladavala kod predaka goveda i da se supstitucija *GC/AA* dogodila vrlo rano, čak i prije procesa domestikacije goveda. Naime, prisutnost alelne varijante za alanin

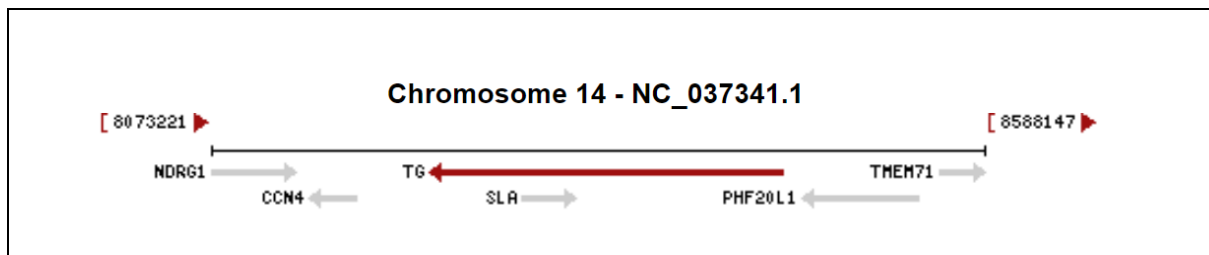
(AA) na poziciji *K232A* pronađena u *Bos taurus* goveda s područja Anatolije u kojoj se dogodio jedan od domestikacijskih procesa (Winter i sur. 2002.).

Supstitucija aminokiseline lizin alaninom ima utjecaj na kemijski sastav mlijeka. Grisart i sur. (2002.), Spelman i sur. (2002.), Thaller i sur. (2003a.) utvrđuju povezanost polimorfizma *DGAT1* gena s većom proizvodnjom mlijeka i većom količinom mliječne masti u različitim pasmina goveda. Iako u istraživanjima koriste različite pasmine i različit broj jedinki rezultati su vrlo slični: *K* alelna varijanta *K232A* polimorfizma povezuje se s većim udjelom masti i proteina, većom proizvodnjom masti, ali manjom ukupnom proizvodnjom mlijeka. Slične rezultate utvrđuju Bovenhuis i sur. (2015.) na populaciji holštajnsko frizijskih krava koji navode povezanost *K* alela s većom proizvodnjom i udjelom masti, proteina i laktoze te manjom proizvodnjom mlijeka. Navedeno je rezultat veće enzimatske aktivnosti alelne varijante *K* u proizvodnji triglicerida u odnosu na varijantu *A* (Grisart i sur. 2004.). Na kvalitetu mlijeka, osim kemijskog sastava važan utjecaj ima i mikrobiološka komponenta, odnosno broj somatskih stanica koja ujedno odražava zdravstveno stanje mliječne žlijezde. Barbosa da Silva i sur. (2010.), Manga i Riha (2011.), Bobbo i sur. (2018.) u svojim istraživanjima navode povezanost polimorfizma *K232A* s brojem somatskih stanica. Tako Manga i Riha (2011.) na populaciji holštajn krava utvrđuju da su jedinice *KA* genotipa imale 1,1 puta manje somatskih stanica u odnosu na jedinice *AA* genotipa (*KA* 1.94 : *AA* 2.18 log, 1000/mL) te da je razlika bila značajna. Iako su jedine *KK* genotipa imale najmanji broj somatskih stanica (*KK* 1.47 log, 1000/mL) zbog malog broja uzorkovanih jedinki ($N=4$) razlika se nije pokazala statistički značajnom. Suprotno, Bovenhuis i sur. (2015.) nisu zapazili značajan utjecaj polimorfizma *K232A* na broj somatskih stanica.

Istraživanjem genoma omogućeno je povezivanje djelovanja gena na nekim osobinama od interesa. Winter i sur. (2002.) utvrdili su neposrednu blizinu između *DGAT1* lokusa i lokusa za kvantitativna svojstva (*engl. Quantitative Trait Loci, QTL*) odgovornog za varijacije u sadržaju mliječne masti. Winter (2002.) navodi da je unutar i u neposrednoj blizini *DGAT1* gena pronađeno je 10 varijabilnih pozicija koje se dovode u direktnu vezu sa sadržajem masti te je *DGAT1* je predložen kao gen kandidat za ovo svojstvo. Noviji podaci u *QTL* bazi podataka navode 73 različitih osobina i 279 *QTL*-a povezanih s *DGAT1* genom (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/genesrch?gwords=dgat1&submit=go>).

2.2. Tiroglobulin

Tiroglobulin ili *TG* gen lociran je na nalazi se na kromosomu *BTA14*. Tiroglobulin je perkursor je hormona štitnjače za koje je poznato da utječu na diferencijaciju adipocita i metabolizam lipida. Hormoni štitnjače igraju važnu ulogu u regulaciji metabolizma i mogu utjecati na homeostazu taloženja masti. Gen je dužine 8.4 Kb i sastoji se od 47 egzonskih regija (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_173883.2; Slika 2.2.). Tiroglobulin gen mapiran je na lokus za kvantitativne osobine i smatra se funkcionalnim i pozicijskim kandidatom debljine masti.



Slika 2.2. Prikaz tiroglobulin (*TG*) gena s naznačenom duljinom gena i susjednim genima (NDRG1 N-myc downstream regulated 1, CCN4 cellular communication network factor 4, SLA Src like adaptor, PHF20L1 PHD finger protein 20 like 1, TMEM71 transmembrane protein 71) (Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/280706>)

Zhang i sur. (2015.) predlažu da *TG* gen bude gen za kvantitativna (*QTL*) svojstva jer može utjecati na svojstva lipida i proizvodne osobine različitih mesnih pasmina goveda, posebice mramoriranost (Barendse i sur. 2001., Burrell i sur. 2004.). No, Casas i sur. (2005., 2007.) nisu utvrdili značajan utjecaj polimorfizma *TG* gena na mramoriranost u mesnih pasmina goveda. Jedinke genotipa *TT* imale su jače i izraženije mramorirano meso, nego jedinke *CC* i *CT* genotipa (Barendse 1999., Burrell i sur. 2004.). Prva istraživanja polimorfizma *TG* gena otkrila su polimorfizam *C422T* koji je u populaciji *Bos indicus* bio zastupljen oko 1.5%, a u *Bos taurus* populaciji od 6,7% do 18.9% (Moore i sur. 2003., Thaller i sur. 2003.). No, značajan utjecaj polimorfizma *TG* gena na udio intramuskularne masti u *m. longissimus dorsi* njemačkog holštajna utvrdili Thaller i sur. (2003.). Nove polimorfizme *TG* gena navode Shin i Chung (2007.), Gan i sur. (2008.) i Zhang i sur. (2015.). Shin i Chung (2007.) navode dva nova polimorfizma *C257T* i *A335G* kod izvorne korejske pasmine goveda utvrđenih kod 12 jedinki (od ukupno 309 uzorkovanih). Isti autori navode suprotan rezultat povezanosti mramoriranosti mesa i genotipa *TG* gena od rezultata Barendse (1999.) i Burrell i sur. (2004.). Naime meso jedinki genotipa *CC* i *CT* bilo je jače mramorirano od mesa jedinki *TT* genotipa. Šest novih mutacija na 3' bočnim regijama *TG* gena: *A110T*, *G133C*, *G156A*, *C220T*, *A351G* i *A506C* pronašli su Gan i sur. (2008.) istraživanjem osam pasmina goveda. Od njih šest samo su četiri mutacije pokazivale značajnu povezanost s mramoriranosti mesa (*G133C*, *G156A*, *C220T* i *A506C*). No, navedena četiri polimorfizma bila su povezana što znači da se može naslijediti kao cjelina, što je i razlog značajne povezanosti s mramoriranosti. Nadalje, Zhang i sur. (2015.) pronalaze četiri nova *SNP* polimorfna mjesta u 5' bočnoj regiji *TG* gena goveda. Analizom je utvrđeno da su *SNP G275A*, *G277C*, *G280A* i *C281G* značajno povezani s prosječnim dnevnim porastom ($P < 0,01$ za *G275A* i *G277C*, $P < 0,05$ za *G280A* i *C281G*).

Molekularna genetika i povezanost osobina od interesa s gen kandidatima iz dana u dan napreduju. U budućnosti će biti potreban daljnji istraživački rad na korištenju navedenih *SNP*-ova za MAS na većoj populaciji i na istraživanju povezanosti *TG* gena s intramuskularnom masti.

2.3. Pasmine goveda

2.3.1. Belgijsko plavo govedo

Belgijsko plavo (*eng. Belgian Blue*) govedo podrijetlom je iz središnje i gornje Belgije i ubraja se u najbolja tovna goveda zbog izražene muskulature. Pasmina je nastala u drugoj polovici 19. stoljeća križanjem bikova *Shorthorn* pasmine radi poboljšanja domaće populacije krava koje su uglavnom bile mliječnog tipa (prosječna proizvodnja u 305. dana laktacije bila 4.000 litara mlijeka sa 3.5% mliječne masti). Do 1950. godine selekcija se temeljila na uzgoju životinja za dvostruka proizvodna svojstva (mlijeko i meso) da bi se 1973. godine usmjerila na dva proizvodna pravca, proizvodnju mesa i mlijeka.

Tjelesni okvirom je krupna životinja, zaobljenih mišića koji su istaknuti na području ramena, leđa, slabina i trbuha. Koža je tanka. Noge su jake i lako se kreće. Belgijsko plavo govedo dobilo je ime po sivo-plavoj pepeljastoj boji, ali boja može varirati od bijele do crne. Pasmina je poznata po mirnom temperamentu. Vrlo je adaptabilna na različite klimatske uvjete i tla, što je rezultiralo širenjem na svjetskoj razini

Tjelesna masa odraslog bika iznosi od 1.100 do 1.250 kg, a visina grebena od 1,45 do 1,50 m. Nije rijetko vidjeti bikove i do 1.300 kg. Krave mogu doseći težinu od 850 do 900 kg, a visina grebena može prijeći 1,40 m. Prosječna dob prvog telenja je sa oko 32 mjeseca starosti, a 75% krava prvi put se teli između 28 i 35 mjeseca.

Fenotip s dvostrukim mišićjem je nasljedna osobina koja rezultira hipertrofijom, tj. povećanjem veličine mišićnih stanica. Ovakva goveda u prosjeku imaju veći udio mišića za oko 20% dok je udio intramuskularne masti smanjen, te ih odlikuje visoki randman 65-70%. Intenzivan rast mišićnog tkiva započinje dobi od 4 do 6 tjedana. Kada se koristi u programima križanja s drugim mliječnim ili mesnim pasminama, prinos križanaca se povećava za 5-7%. Meso je dobre kvalitete, nježno, a zbog manjeg udjela intramuskularne masti, ima dijetetske karakteristike.



Slika 2.1. Belgijsko plavo govedo

(Izvor: <https://alchetron.com/Belgian-Blue#belgian-blue-67c6557e-6b99-48f4-991a-f418ff093a0-resize-750.jpeg>)

2.3.2. Holštajn govedo

Holštajn govedo je najmlječnija i najrasprostranjenija pasmina po svijetu. Potječe iz Nizozemske, provincija *North Holland* i *West Friesland*. Preci današnje pasmine Holstein goveda na prostore Nizozemske došli su prije 2000 godina migracijama plemena s juga Europe. Na početku uzgoja krave su bile jednobojne, crne, bijele ili crvene boje, a nakon 1975. godine uzgajivači u uzgoju koriste bikove samo crne ili bijele boje (iako se i danas u uzgoju mogu naći jединke crveno-bijele boje). U uzgoju prevladava crno-bijeli dominantni holštajn, dok se crveno-bijeli javlja u svega 1% slučajeva. Sustavnom selekcijom dobivena je pasmina izvrsnih mliječnih osobina, dobre prilagodljivost, dobre plodnosti i eksterijera.

Pasmina je velikog tjelesnog okvira i dobrih mliječnih karakteristika. Tjelesna masa odraslih krava iznosi oko 650-700 kg, visina grebena 140 cm. Proizvodnja mlijeka holštajn pasmine u svjetskoj domeni može biti i veća od 10.000 litara mlijeka (uz odgovarajuću hranidbu i uvjete držana). U Republici Hrvatskoj proizvodni kapacitet je oko 8.000 litara mlijeka sa 4,0% mliječne masti i 3,3% kg proteina tijekom 305 dana laktacije (HPA, 2018.). Krave se tele jednom godišnje, porodna masa teladi je oko 40-50 kg, a telenja su laka i bez zdravstvenih poremećaja. Spolnu zrelost stječu između 15 i 21 mjeseca starosti, a prvi pripust prakticira se sa 21-24 mjeseca starosti kad postignu 80% tjelesne mase odrasle jedinke. U intenzivnom uzgoju se najviše prakticira metoda umjetnog osjemenjivanja i genomski testiranih mladih bikova što je doprinijelo komercijalizaciji i povećanom interesu tržišta, kao i genetskom poboljšanju pasmine.

Holštajn govedo zahtjeva dobar smještaj, te je osjetljivo i podložno oboljenjima i neplodnosti, ako ne postoje optimalni uvjeti. Iskorištavanje holštajn krava u proizvodnji mlijeka je intenzivno, zbog toga im je proizvodni vijek relativno kratak (od 3 do 4 godine). U mesnoj proizvodnji postiže skromne rezultate zbog nižih ostvarenih prirasta i slabije konverzije hrane te ranijeg zamašćivanja. Randman holštajn goveda relativno je nizak i iznosi oko 57%.



Slika 2.2. Holštajn govedo

(Izvor: Ramljak, J.)

3. MATERIJAL I METODE

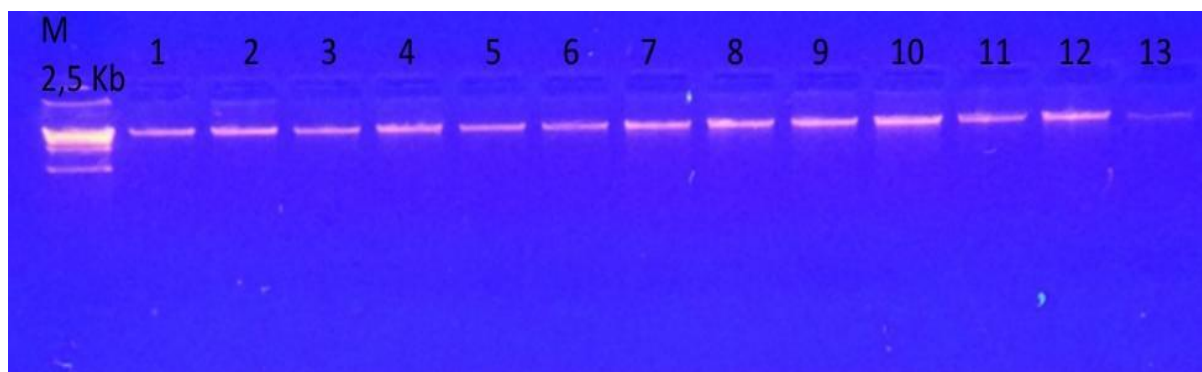
3.1. Laboratorijske analize

3.1.1. Izolacija DNK iz tkiva

Od križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda iz dugog leđnog mišića uzet je komadić mesa mase oko 25 mg i stavljeni u tube od 1,5 mL. Iz uzoraka tkiva izolirana je deoksiribonukleinska kiselina (DNK) korštenjem *GenElute™ Mammalian Genomic DNA* kita (Sigma-Aldrich).

Za razgradnju tkiva i raspadanje mišićnih stanica u tube s uzorcima tkiva dodano je 180 μ L *Lysis* otopine T i 20 μ L proteinaze. Uzorci su dobro izmiješani na vorteksu i stavljeno na inkubaciju (70°C, 10 min) za potpuni razgradnju. Dodana je otopina za liziranje C (200 μ L *lysis solution* C) i uzorci su miješani na vorteksu 20 sekundi. Potom je u tubu s uzorkom dodano je 200 μ L hladnog 96% etanola, smjesa je snažno protresena u trajanju od 10 sekundi sa svrhom dobivanja homogene smjese, odnosno lizata. Tubice s kolonama isprane su s 500 μ L otopine za pripremu kolona, potom je u njih stavljen lizat i centrifugiran 1 min na 6 600 rcf i ispran u dva navrata s 500 μ L otopine za ispiranje (*wash solution*). Nakon svakog ispiranja uslijedilo je centrifugiranje: 1 min na 6 600 rcf (nakon prvog ispiranja) i prebacivanje kolona u čiste 2,0 mL tubice, 3 min na 14 000 rcf (nakon drugog ispiranja). Otapanje DNK provedeno je s otopinom za otapanje DNK (*elution solution*, 80 μ L), inkubacijom na sobnoj temperaturi (5 min) i centrifugiranjem (1 min, 6600 rcf). Kako bi se dobila veća količina DNK, postupak otapanja je ponovljen još jednom. Nakon drugog otapanja u tubi je ostala čista DNK. Na 1% agaroznom gelu provjerena je kvaliteta izolirane DNK u otopini korištenjem gel elektroforeze (slika 3.1.). Izolirana DNK je do upotrebe bila pohranjena u zamrzivaču na temperaturi -20°C.

Izrada 1% agaroznog gela odvijala se po protokolu: 0,30 g agaroze (*Fluka, BioChemika*) i 30 mL 10x *TBE* pufera (zagrijavani do homogene smjese), hlađenje smjese na sobnu temperaturu, dodavanje 1 μ L etidijevog bromida. Nakon stvrdnjavanja gela, u jažice je stavljeno 1 μ L aplikacijskog pufera i 5 μ L izolata (DNK). Elektroforeza je trajala 15 minuta na 120 V.



Slika 3.1. Izolirana DNK križanaca belgijsko plavog i holštajn na 1% gelu agaroze. Marker je veličine 2,5 Kb (prvi stupac). Broj uzorka označen je rednim brojevima od 1 do 13.

3.1.2. Lančana reakcija polimeraze

Umnažanje sekvence *DNK* od interesa provodi se lančanom reakcijom polimeraze, tzv. *PCR* reakcijom (*engl. Polymerase Chain Reaction*) kojom nastaje milijun kopija željene sekvence. Reakcija *PCR* za *DGAT1* i *TG* gen provedena je prema protokolu proizvođača s *Takara Emerald Amp® MAX HS PCR Master Mix* u ukupnom volumenu od 15 µL i prikazana je u tablici 3.1.. Umnažanje ciljne *DNK* odvijalo se u 35 ciklusa na aparatu *Mastercycler Thermocycler* (*Eppendorf*).

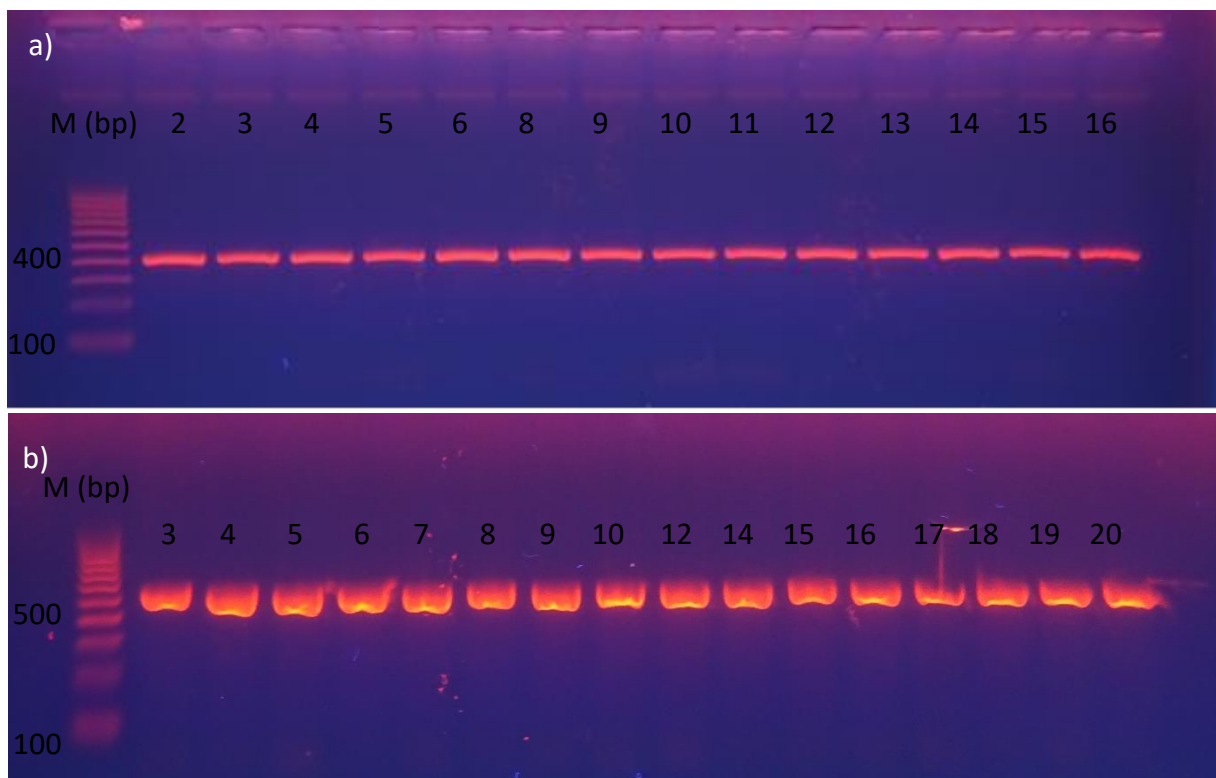
Tablica 3.1. Komponente lančane reakcije polimerazeza *DGAT1* i *TG* gen i program umnažanja sekvence od interesa

Komponente i program/gen	<i>DGAT1</i>	<i>TG</i>
voda slobodne od nukleaza	5,4 µL	5,4
<i>Emerald Amp® MAX HS PCR Master Mix</i>	7,5 µL	7,5
začetni oligonukleotid prema naprijed* 10 µM 5'- GCA CCA TCC TCT TCC TCA AG -3'	0,45 µL	0,45 µL
začetni oligonukleotid prema natrag** 10 µM 3'-GGA AGC GCT TTC GGA TG -5'	0,45 µL	0,45 µL
50 ng genomska <i>DNK</i>	1,2 µL	1,2 µL
Program umnažanja željene sekvence <i>PCR</i> reakcijom	<i>DGAT1</i>	<i>TG</i>
aktivacija <i>Taq</i> polimeraze	98°C/3 min	98°C/3 min
Denaturacija	98°C/10 sek	98°C/10 sek
prilijeganje začetnih oligonukleotida	61°C/30 sek	63,5°C/30 sek
produljenje <i>DNK</i> lanc	72°C/50 sek	72°C/50 sek
krajnje produljenje umnožene željene sekvence <i>DNK</i>	72°C/5 min	72°C/5 min
Hlađenje	4°C/∞	4°C/∞

začetni oligonukleotid prema naprijed* (*engl. forward*)

začetni oligonukleotid prema natrag** (*engl. reverse*)

Provjera uspješnosti umnažanja sekvenci *DGAT1* gena i *TG* gena *PCR* reakcijom (slika 3.2. a i b) urađena je na 1% agaroznom gelu (opis pod 3.1.1.).



Slika 3.2. Amplifikacija lančanom reakcijom polimeraze: a) *DGAT1* gena duljine 411 parova baza (bp); 2-16 – oznake uzoraka i b) *TG* gena duljine 545 bp križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda; 3-20 – oznake uzoraka. M – standard razmaka 100 bp

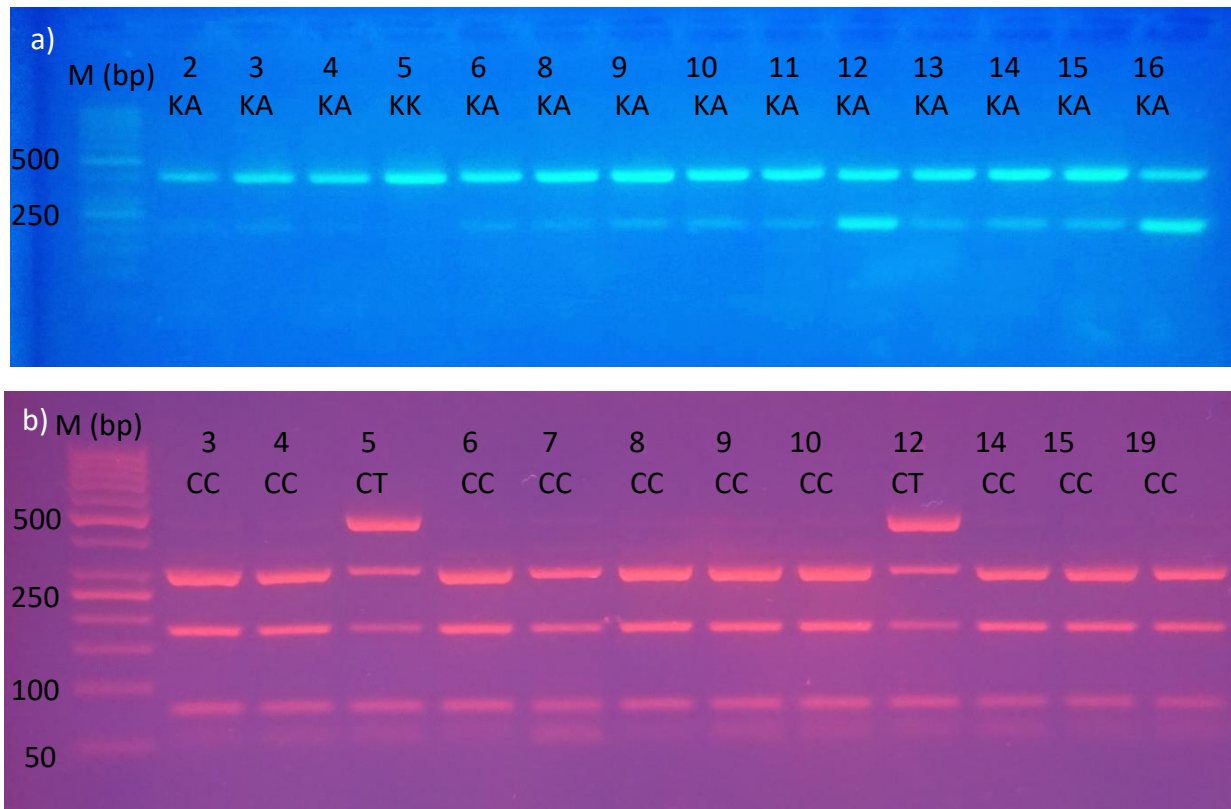
3.1.3. Genotipizacija

Za potrebe genotipizacije umnoženi fragmeti *DGAT1* gena dužine 411 bp i *TG* gena dužine 545 bp izloženi su restrikciji korištenjem enzima endonukleaza. Enfonukleaza *CfrI* cijepala je fragment *DGAT1* gena, a endonukleaza *PsuI* fragment *TG* gena. Smjesa za restrikciju za oba gena bila je volumena 20 μ L (7,88 μ L vode, 2,0 μ L 10x Tango pufera, 0,12 μ L *CfrI/PsuI* restrikcijskog enzima, 10 μ L *PCR* produkta). Inkubacija u vodenoj kupelji odvijala se na 37°C preko noći za oba gena.

Za potrebe genotipizacije napravljen je 3% agarozni gel (0,90 g agaroze i 30 mL 1x TBE pufera u koje je dodano 1 μ L etidijevog bromida). U jažice pripremljenog gela stavljeno je 20 μ L produkata restrikcijske razgradnje te provedena elektroforeza na 100 V u trajanju od 60 min. Vizualizacija uzoraka bila je pod UV svijetlom na transiluminatoru.

Genotipizacijom su uočeni fragmenti gena niže navedenih veličina (slika 3.3.):

- *DGAT1* gen dužine 411 bp:
 - *KK* (411); *KA* (411, 208, 203); *AA* (208, 203)
- *TG* gen dužine 545 bp:
 - *TT* (473); *CT* (75, 178, 295, 473); *CC* (295, 178, 75)



Slika 3.3. Dobiveni genotipovi: a) *DGAT1* gena (KA 411 bp, KK 208, 203 bp) i b) *TG* gena (CC 295, 178, 75bp; CT 75, 178, 295, 473bp) križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda. M – standard razmaka 100 bp; 2-16 i 3-19 – oznake uzoraka

3.1.4. Statističke analize

Statistička analiza podataka provedena je korištenjem R programskog paketa (*R Core Team 2018.*). Unutar R programa korišten je paket „HardyWeinberg“ korišten za određivanje frekvencije alela i frekvencije genotipova *DGAT1* i *TG* gena. Također primjenom hi-kvadrat testa (χ^2) izračunato je odstupanje frekvencije alela i genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže.

Pokazatelji genetske strukture populacija, uočena (H_0) i očekivana (H_E) heterozigotnost, indeks uzgoj u srodstvu (F_{IS}) izračunati su korištenjem programa *Genetix v4.05.2* (Belkhir i sur. 2004.).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Polimorfizam *DGAT1* i *TG* gena

Osnovni parametri polimorfizma *DGAT1* i *TG* gena križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda prikazani su u tablici 4.1. Polimorfizam gena *DGAT1* utvrđen je kod 39 od 42 jedinke (93%), a *TG* gena kod 40 od 42 jedinke (95%).

Tablica 4.1. Frekvencije (f) alela i genotipova i Chi-kvadrat test (χ^2) *DGAT1* i *TG* gena križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda

<i>DGAT1</i>						
<i>N</i>	<i>f</i> alela		<i>f</i> genotipova			χ^2
	<i>K</i>	<i>A</i>	<i>KK</i>	<i>KA</i>	<i>AA</i>	
39	0,551	0,449	0,897 (35)	0,103 (4)	0	25,84 **
<i>TG</i>						
<i>N</i>	<i>f</i> alela		<i>f</i> genotipova			χ^2
	<i>C</i>	<i>T</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
40	0,888	0,112	0,800 (32)	0,175 (7)	0,025(1)	0,61 ^{ns}

ns – nije značajno, ** $p < 0,01$

Udio alelne varijante *K* *DGAT1* gena prevladava sa 55,1% ($f_K = 0,551$), dok je udio alelne varijante *A* manji 44,9% ($f_A = 0,449$). U ispitivanom uzorku populacije ($N = 39$) kod 35 jedinki utvrđen je genotip *KK* s frekvencijama 0,897 te 4 jedinke genotipa *KA* frekvencije 0,103. Genotip *AA* *DGAT1* gena nije utvrđen kod nijedne jedinke. Hradecka i sur. (2008.) proučavajući 315 bikova pasmine njemački holštajn utvrdili su frekvencije 0,340 za alel *K* i 0,660 za alel. Isti autori navode podjednaku zastupljenost genotipova *AA* i *KA* (0,460 : 0,400), dok je frekvencija homozigotnog genotipa *KK* iznosila 0,14 kod samo četiri jedinke. U ispitivanom uzorku frizijskog i džersez (*Jersey*) goveda frekvencije alelne varijante *A* bile su 0,410 i 0,48 što je usporedivo s rezultatima ovog istraživanja (Signorelli i sur. 2009.). No, izrazito niska frekvencija utvrđena je u piedmontese pasmine ($f_A = 0,030$), dok je u genomu valdostana pasmine nije prisutna. Kadlecová i sur. (2014.) u uzorku od 278 krava holštajnske pasmine navode frekvencije alelnih varijanti ($f_A = 0,740$) i ($f_K = 0,260$). U odnosu na rezultate ovog istraživanja, Tomka i sur. (2016.) dobili su suprotne rezultate istražujuću polimorfizam *DGAT1* gena u populaciji nizozemskog holštajn-frizijskog goveda. Udio alelne varijante *K* bio je 4,5 puta manji (0,120 : 0,551), dok je udio alelne varijante *A* bio dva puta veći (0,880 : 0,449). Također, utvrđen je visok udio homozigota *AA* (0,780) koji u ovom istraživanju nije utvrđen, udio heterozigota *KA* bio je puno manji u odnosu na ovo istraživanje (0,200 : 0,897), a udio homozigota *KK* bio svega 0,020 (u ovom istraživanju visokih 0,897). Bonvehius i sur (2015.) na uzorku od oko 1,500 jedinki nizozemskog holštajn-frizijskog goveda nisu utvrdili značajnu promjenu frekvencije alela prema redoslijedu laktacije ($f_K = 0,400$).

Dobiveni rezultati istraživanja znatno se razlikuju iako su korištene metode vrlo slične ili identične. Jedno od mogućih razloga razlike u frekvencijama alela i genotipova *DGAT1* gena zasigurno je samo uzorkovanje (broj uzoraka, stupanj srodstva) i metodologija rada i obrade

podataka. Nadalje, Kaupe i sur. (2004., cit. Winter i sur. 2002.) navode da je alel koji kodira aminokiselinu lizin ancestralan u goveda i pošto negativno utječe na količinu proizvedenog mlijeka, njegova frekvencija u mliječnim pasminama je umjerena do niska. No, korištenjem metode umjetnog osjemenivanja i uvozom sjemena bikova (uglavnom iz Amerike, Kanade i Nizozemske) frekvencija alela *K* znatno se povećala. Zahtjevi tržišta sredinom 20. stoljeća bili su fokusirani na veću potražnju maslaca čija je glavna komponenta mliječna mast.

DGAT1 gen kao gen kandidat za proizvodne osobine mlijeka i mesa potvrđen je u mnogim istraživanjima koristeći se alel supstitucijskim učinkom (*engl. allele substitution effect*, Grisart i sur., 2002., Winter i sur., 2002, Thaller i sur. 2003.). Istraživanje na uzorku njemačkog holštajn i šarole (*Charolais*) goveda provedeno od strane Thallera i sur. (2003.) pokazalo je značajan utjecaj genotipa *KK DGAT1* gena na sadržaj intramuskularne masti u *musculus semitendinosus*, ali ne i u *m. longissimus dorsi*. Suprotno, vezu *DGAT1* polimorfizma gena sa nakupljanjem masnog tkiva u trupu nisu utvrdili Moore i sur. (2003.) i Pannier i sur. (2010.).

Supstitucija aminokiseline lizin s alaninom DGAT1 gena odgovorna je i u proizvodnji mlijeka, direktno utječući na sadržaj nekih komponenti. Tako kodirajući alel za aminokiselinu lizin (*K*) doprinosi većoj proizvodnji masti, većem sadržaju mliječne masti i proteina, dok je *A* alelna varijanta odgovorna za veću proizvodnju mlijeka (Hradecka i sur. 2008., Signorelli i sur. 2009., Tomka 2016., Kadlecová i sur. 2014.). Ovi rezultati su u suglasju s pravilom o negativnoj korelaciji između mliječnosti i sadržaja masti i proteina. Signorelli i sur. (2009.) navode učinak supstitucije aminokiselinom lizin za 0,55% za mliječnu mast i 0,13% za protein, dok je proizvodnja mlijeka bila manja za 2,4 kg. Također, Spelman i sur. (2002.) navode da lizin kodirajuća varijanta DGAT1 gena povećava sadržaj proteina za 2-3 kg i sadržaj mliječne masti za 3-6 kg, ovisno o pasmini. Alelna varijanta *A* odgovorna je za veću proizvodnju mlijeka.

Oikonomou i sur. (2008.) istraživali su utjecaj polimorfizma *DGAT1* gena na reprodukcije pokazatelje na uzorku holštajn krava i zaključili da je alelna varijanta *A* povezana s učestalijim inseminacijama, smanjenom stopom začeca tijekom laktacije i povećanom učestalosti reproduktivnih problema.

Frekvencije alela *C* i *T* *TG* gena znatno su se razlikovale. Udio *T* alela u ispitivanom uzorku bio je za 7,9 puta manji od udjela alela *C* ($f_T = 0,112$: $f_C = 0,888$). Uočena su sva tri genotipa *TG* gena od kojih je prevladavao je homozigotni *CC* genotip ($f_{CC} = 0,800$) utvrđen kod 32 jedinke, zatim heterozigotni genotip *CT* ($f_{CT} = 0,175$) utvrđen kod 7 jedinki, dok je homozigotni *CC* genotip utvrđen samo kod jedne jedinke ($f_{CC} = 0,025$). Iste vrijednosti alelnih varijanti *T* i *C* u istraživanom uzorku bikova holštajn-frizijske pasmine utvrdili su Ardici i sur. (2019.; $f_T = 0,112$: $f_C = 0,888$). Također, kod najvećeg broja jedinki utvrđen je *CC* genotip ($f_{CC} = 0,804$), zatim *CT* ($f_{CT} = 0,155$), a najmanji broj jedinki imalo je *TT* genotip ($f_{TT} = 0,040$). Pannier i sur. (2010.) za devet proučavanih pasmina goveda navode frekvenciju alela *C* u rasponu od 0,51 (Angus) do 0,98 (Hereford), dok je frekvencija alela *A* imala raspon od 0,02 (Hereford) do 0,49 (Angus). Isti autori su utvrdili slične vrijednosti polimorfizama *TG* gena za pasmine belgijsko plavo ($f_C = 0,820$, $f_T = 0,180$) i frizijsku pasminu goveda ($f_C = 0,870$,

($f(\tau) = 0,130$). Ove vrijednosti slične su vrijednostima križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda u ovom istraživanju. Proučavajući izvorne pasmine anatolskih goveda (*South Anatolian Red*, *East Anatolian Red*) na kojima nije provođena selekcija Yardibi i sur. (2009.) dobili su ravnomjernije udjele frekvencija alela za južno anatolsko crveno govedo ($f(c) = 0,420$, $f(\tau) = 0,580$), dok su za istočno anatolsko crveno govedo omjeri bili više različiti ($f(c) = 0,750$, $f(\tau) = 0,250$).

U više istraživanja utvrđeno je da kromosom *BTA14* sadrži *QTL* za svojstva maramoriranosti. Moguće alelne kombinacije na lokusima važne su za uspješnu primjenu selekcije uz pomoć markera (*engl. Marker Assisted Selection, MAS*) kod pasminama goveda u komercijalnoj proizvodnji mesa. U direktnu vezu količinu intramuskularne masti u *m. longissimus dorsi* s polimorfizmom *TG* gena utvrđuju Mears i sur. (2001.), Thaller i sur. (2003.), Burrell i suradnici (2004.). Barendse i suradnici (2004.) utvrdili su da genotip *TT* ima veći postotak maramoriranosti mesa u usporedbi sa jedinkama *CC* i *CT* genotipa aberden angus (*Aberdeen Angus*) i šothorh (*Shorthorn*) pasmina. No, Pannier i sur. (2010.) nisu utvrdili povezanost polimorfizma *TG* gena sa sadržajem intramuskularne masti u *m. longissimus thoracis et lumborum* i *m. semimembranosus*. Meso jedinki *CC* genotipa *TG* lokusa imale su jači stupanj maramoriranosti mesa koji nije bio statistički značajan. Navedeno je u skladu s prijašnjim istraživanjima *Bos indicus* (Casas i sur. 2005.) i *Bos taurus* goveda (Rincker i sur. 2006.). Također, Ardicli i sur. (2019.) u istraživanju nisu utvrdili značajan utjecaj polimorfizma *TG* gena na tovnе karakteristike jedinki holštajn pasmine. Pojašnjenje dobivenih oprečnih rezultata različitih istraživanja može biti da polimorfizam *TG* gena nije utjecao na razinu intramuskularne masti u ispitivanom uzorku te da markeri nisu dovoljno jaki (informativni) ako se u istraživanju koriste križanci (zbog različite frekvencije alelnih varijanti). Također, neka istraživanja uključivala su malen broj pasmina i malo uzorkovanih jedinki, stoga buduća istraživanja trebaju biti što opsežnija i kompleksnija na načina da uključe što više jedinki i/ili različitih pasmina.

Nul-hipoteza da nema razlike u odstupanju uočenih od očekivanih frekvencija genotipova utvrđena je za *TG* lokus ($\chi^2 = 0,61$). Na lokusu *DGAT1* uočena frekvencija genotipova uzorkovanih jedinki značajno ($p < 0,01$) je odstupala od frekvencije genotipova populacije koja se nalazi u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži ($\chi^2 = 25,84$). Pannier i sur. (2010.) također nisu zapazili razlike u odstupanju uočenih od očekivanih frekvencija genotipa *DGAT1* i *TG* gena za svih devet proučavanih pasmina. U ovom istraživanju značajno odstupanje očekivanih frekvencija genotipova *DGAT1* gena od frekvencije genotipova populacije u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži najvjerojatnije je posljedica neutvrđenog genotipa *AA* u uzorkovanom materijalu.

4.2. Genetska struktura ispitivanog uzorka

Vrijednosti genetskih parametara, uočene i očekivane heterozigotnosti te fiksacijskog indeksa (koeficijenta uzgoja u srodstvu) za procjenu genetske raznolikosti u uzroku križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda prikazani su u Tablici 4.2.

Tablica 4.2. Broj jedinki (N) uočena (H_O) i očekivana (H_E) heterozigotnost, fiksacijski indeks (F_{IS}) *DGAT1* i *TG* gena križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda

<i>DGAT1</i>				<i>TG</i>			
N	H_O	H_E	F_{IS}	N	H_O	H_E	F_{IS}
39	0,897	0,495	-0.809**	40	0,200	0,175	0,131 ^{ns}

ns – nije značajno, ** $p < 0,01$

Uočena heterozigotnost križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda za *DGAT1* gen bila je 0,897, a očekivana 0,495. Za *TG* gen vrijednosti za uočenu i očekivanu heterozigotnost bile su puno manje ($H_O = 0,200$, $H_E = 0,175$). Na lokusu *DGAT1* utvrđen je značajan višak heterozigornih jedinki (81%), dok je na *TG* lokusu zapažen deficit heterozigota (13%) koji nije bio značajan. Ardicli i sur. (2019.) navode populacijske parametre za heterozigotnost koje su djelomično komparabilni s ovim istraživanjem; *DGAT1* gen ($H_O = 0,500$, $H_E = 0,499$) i *TG* gen ($H_O = 0,789$, $H_E = 0,211$). U ranijem istraživanju holštajn pasmine Tomka i sur. (2016.) navode niske vrijednosti za parametre heterozigotnosti *DGAT1* gena ($H_O = 0,200$, $H_E = 0,210$). Niska genetska varijabilnost promatranog uzorka (H_E) križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda *TG* gena rezultat je slabe zastupljenosti i niske frekvencije alela T ($f(T) = 0,112$). Također, niske vrijednosti za heterozigotnost kao rezultat neravnomjerne zastupljenosti alelnih frekvencija navode Tomka i sur. (2016.) i Ardicli i sur. (2019.). Jedno od pojašnjenja viška heterozigotnih jedinki na lokusu *DGAT1* je moguća podpodjela ispitivanog uzorka korištenjem sjemena nekoliko linija bikova.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu provedenog istraživanja polimorfizma *DGAT1* i *TG* gena u uzorku križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda:

- a. utvrđene su frekvencije alela
 - *DGAT1* gena: $f(K) = 0,551$, $f(A) = 0,449$,
 - *TG* gena: $f(T) = 0,112$: $f(C) = 0,888$.
- b. utvrđene su frekvencije genotipova
 - *DGAT1* gena: $f(KK) = 0,897$, $f(KA) = 0,103$, $f(AA)$ = nije utvrđen,
 - *TG* gena: $f(CC) = 0,800$, $f(CT) = 0,175$, $f(TT) = 0,025$.
- c. utvrđene frekvencija genotipova križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda:
 - na lokusu *DGAT1* značajno ($p < 0,01$) odstupaju od frekvencije genotipova populacije koja se nalazi u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži,
 - na lokusu *TG* ne odstupaju od frekvencije genotipova populacije koja se nalazi u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.
- d) dobiveni genetski parametri polimorfizma *DGAT1* i *TG* gena usporedivi su s rezultatima znanstvenih istraživanja. Vrijednosti frekvencije alela, frekvencije genotipova, uočene i očekivane heterozigotnosti te fiksacijskog indeksa (koeficijenta uzgoja u srodstvu) nalaze se između graničnih vrijednosti drugih istraživanja. Za pojašnjenje utvrđenog značajnog deficita heterozigotnih jedinki na lokusu *DGAT1* križanaca belgijskog plavog i holštajn goveda potrebno je provesti opsežnije analize uključivanjem većeg broja nesrodnih jedinki i znati podatke o porijeklu (linije bikova).

6. POPIS LITERATURE

1. Ardicli S., Dincel D., Samli H., Balci F. (2016). Effects of polymorphisms at LEP, CAST, CAPN1, GHR, FABP4 and DGAT1 genes on fattening performance and carcass traits in Simmental bulls. *Archives Animal Breeding*. 60: 61–70.
2. Barbosa da Silva M. V. G., Sonstegard T. S., Thallman R. M., Connor E. E., Schnabel R. D., C. P. Van Tassell. (2010). Characterization of DGAT1 allelic effects in a sample of North American Holstein cattle. *Animal Biotechnology*. 21: 88–99.
3. Barendse W., Bunch R., Thomas M., Armitage S., Baud S., Donaldson N. (2001). The TG5 DNA marker test for marbling capacity in Australian feedlot cattle. Dostupno na: www.Beef.crc.org.au/Publications/LatestPublications/feeder2002/session6/6a.html. accessed - pristup 11.09.2020.
4. Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (1996-2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Genome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France. URL:<http://www.genetix.univmontp2.fr/genetix/intro.htm>.
5. Bobbo T., Tiezzi F., Penasa M., De Marchi M., Cassandro M. (2018). Short communication: Association analysis of diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) mutation on chromosome 14 for milk yield and composition traits, somatic cell score, and coagulation properties in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*. 101: 8087-8091.
6. Bovenhuis H., Visker M. H. P. W., Poulsen N. A., Sehested J., van Valenberg H. J. F., van Arendonk J. A. M., Larsen L. B., Buitenhuis A. J. (2015). Effects of the diacylglycerol o-acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism on fatty acid, protein, and mineral composition of dairy cattle milk. *Journal of Dairy Science*. 99(4): 3113-3123.
7. Burrell D. N., Moser G. H. D., Hetzel J., Mizoguchi Y. S. S. (2004). Meta Analysis Confirms Associations of the TG5 Thyroglobulin Polymorphism with Marbling in Beef Cattle. 29th International Conference on Animal Genetics. ISAG. Tokyo.
8. Casas E., White S. N., Riley D. G., Smith T. P. L., Brenneman R. A., Olson T. A., Johnson D. D., Coleman S. W., Bennett G. L., Chase Jr. C. C. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for 21 association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.* 83: 13- 19.
9. Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibé B., Bouix J., Caiment F., Elsen J. M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C., Georges M. (2006). A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics*. 38: 813–818.
10. Davis G.H., Balakrishnan L., Ross I. K., Wilson T., Galloway S. M., Lumsden B. M., Hanrahan J. P., Mullen M., Mao X. Z., Wang G. L., Zhao Z. S., Zeng Y. Q., Robinson J. J.,

- Mavrogenis A. P., Papachristoforou C., Peter C., Baumung R., Cardyn P., Boujenane I., Cockett N. E., Eythorsdottir E., Arranz, J. J., Notter D. R. (2006). Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecX(l)) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Animal Reproduction Science*. 92: 87–96.
11. Gan X. Q., Wang J. Y., Xi Y., Wu Z. L., Li Y. P., Li L. (2008). Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. *The Journal of cell biology*. 180(6): 1087-1100.
 12. Grisart B., Coppieters W., Farnir F., Karim L., Ford C., Berzi P., Cambisano N., Mni M., Reid S., Simon P., Spelman R., Georges M., Snell R. (2002). Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle. Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research*. 12: 222–231.
 13. Grisart B., Farnir F., Karim L., Cambisano N., Kim J. J., Kvasz A., Mni M., Simon P., Frere J. M., Coppieters W., Georges M. (2004). Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 2398–2403.
 14. Hradecká E., Čítek J., Panicke L., Řehout V., Hanusová I. (2008). The relation of GH1, GHR and DGAT1 polymorphisms with estimated breeding values for milk production traits of German Holstein sires. *Czech Journal of Animal Science*. 53(6): 238–245.
 15. <https://alchetron.com/Belgian-Blue#belgian-blue-67c6557e-6b99-48f4-991a-f418ff093a0-resize-750.jpeg> (pristupljeno: 6 rujna 2020.)
 16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/280706> (pristupljeno: 9 rujna 2020.)
 17. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_173883.2 (pristupljeno: 9 rujna 2020.)
 18. Kadlecová V., Němečková D., Ječmínková K., Stádník L., (2014). Association of bovine DGAT1 and leptin genes polymorphism with milk production traits and energy balance indicators in primiparous Holstein cows. *Milk production traits*. Mljekarstvo. 64: 19-26.
 19. Kaupe B., Winter A., Fries R., Erhardt G. (2004). DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *Jurnal Dairy Research*. 71: 182–187.
 20. Manga I., Říha H. (2011). The DGAT1 gene K232A mutation is associated with milk fat content, milk yield and milk somatic cell count in cattle. *Arch. Tierzucht* 54: 257–263.
 21. Mears G. J., Mir P. S., Bailey D. R. C. (2001). Effect of Wagyu genetics on marbling, backfat and circulating hormones in cattle. *Journal of Animal Science*. 81: 65-73.
 22. Moore S. S., Li C., Basarab J., Snelling W. M., Kneeland J., Murdoch B. et al. (2003). Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos Taurus*. *Journal of Animal Science*. 81: 1919-25.

23. Oikonomou G., Angelopoulou K., Arsenos G., Zygoiannis D., Banos, G. (2008). The effects of polymorphisms in the *DGAT1*, leptin and growth hormone receptor gene loci on body energy, blood metabolic and reproductive traits of Holstein cows. *Animal Genetics*. 40: 10-17.
24. Pannier L., Mullen A. M., Hamill R. M., Stapleton P. C., Sweeney T. (2010). Association analysis of single nucleotide polymorphisms in *DGAT1*, *TG* and *FABP4* genes and intramuscular fat in crossbred *Bos taurus* cattle. *Meat Science*. 85: 515-518.
25. R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org->
26. Rincker C. B., Pyatt N. A., Berger L. L., Faulkner D. B (2006) Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *Journal of Animal Science*. 84: 686-693.
27. Shin S. C., Chung E. R. (2007.) Association of SNP Marker in the Thyroglobulin Gene with Carcass and Meat Quality Traits in Korean Cattle. *Journal of Animal Science*. 2: 172-177.
28. Signorelli F., Orrù L., Napolitano F., De Matteis G., Scatà M. C., Catillo G., Marchitelli C., Moioli B. (2009). Exploring polymorphisms and effects on milk traits of the *DGAT1*, *SCD1* and *GHR* genes in four cattle breeds. *Livestock Science*. 125(1): 74-79.
29. Spelman R. J., Ford C. A., McElhinney P., Gregory G.C., Snell R.G. (2002). Characterization of the *DGAT1* gene in the New Zealand dairy population. *Journal Dairy Science*. 85: 3514–3517.
30. Thaller G., Kühn C., Winter A., Ewald G., Bellmann O., Wegner J., Zuhlke H., Fries R. (2003). *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetic*. 34: 354–357.
31. Thaller G., Kramer W., Winter A., Kaupe B., Erhardt G., Fries R., (2003a). Effects of *DGAT1* variants on milk production traits in German cattle breeds. *Jurnal od Animal Science*. 81 :1911–1918.
32. The Bovine HapMap Consortium (2009). Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. *Science*. 324(5926): 528-532.
33. Tomka J., Vašíčková K., Oravcová M., Bauer M., Huba J., Vašíček D., Peškovičová D. (2016). Effects of polymorphisms in *DGAT1* and *LEP* genes on milk traits in Holstein primiparous cows. *Mljekarstvo*. 66(2): 122-128.
34. Winter A., W. Krämer, F. A. O. Werner, S. Kollers, S. Kata, G. Durstewitz, J. Buitkamp, J. E. Womack, G. Thaller, and R. Fries. (2002). Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 9300–9305.

35. Yardibi H., Hosturk G.T., Paya I., Kaygisiz F., Ciftioglu G., Mengi A., Oztabak K. (2009). Associations of growth hormone gene polymorphism with milk production traits in South Anatolian and East Anatolian Red cattle. *J Anim Vet Adv.* 8: 1040–1044.
36. Zhang L., Wang S., Li H., Deng Q., Zheng A., Li S.(2015). Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F2 populations. *Theory Applied Genetics.* 121(6):1071–82.

ŽIVOTOPIS

Melinda Kazić rođena je 09.03.1997. godine u Zagrebu. Pohađala je Veterinarsku školu, a nakon završene srednje škole upisuje preddiplomski studij – Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Studij završava 2018. godine obranom završnog rada na temu „Svojstva za selekciju u proizvodnji mesa“ pod vodstvom mentora izv. prof. dr. sc. Danijela Karolyia . Nakon završenog preddiplomskog studija upisuje diplomski studij „Proizvodnja i prerada mesa“ na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija počinje raditi u mesnoj industriji „Plukon“ u Nizozemskoj.
