

Utjecaj polimorfizma TG gena na kvalitetu trupova i mramoriranost mesa križanaca simentalske i holštajn pasmine goveda

Jažo, Marija

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:204:186904>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



UTJECAJ POLIMORFIZMA *TG* GENA NA KVALITETU TRUPOVA I MRAMORIRANOST MESA KRIŽANACA SIMENTALSKE I HOLŠTAJN PASMINE GOVEDA

DIPLOMSKI RAD

Marija Jažo

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mesa

**UTJECAJ POLIMORFIZMA *TG* GENA NA KVALITETU TRUPOVA I
MRAMORIRANOST MESA KRIŽANACA SIMENTALSKE I HOLŠTAJN
PASMINE GOVEDA**

DIPLOMSKI RAD

Marija Jažo

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, **Marija Jažo**, JMBAG 0178102543, rođen/a 05.07.1995. u Novoj Gradišci, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

UTJECAJ POLIMORFIZMA TG GENA NA KVALITETU TRUPOVA I MRAMORIRANOST MESA KRIŽANACA SIMENTALSKE I HOLŠTAJN PAMSINE 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 **Marija Jažo**, JMBAG 0178102543, naslova

UTJECAJ POLIMORFIZMA TG GENA NA KVALITETU TRUPOVA I MRAMORIRANOST MESA

KRIŽANACA SIMENTALSKE I HOLŠTAJN PASMINE 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. Danijel Karolyi član

Zahvala

Ovime zahvaljujem cijenjenoj mentorici izv.prof.dr.sc. Jeleni Ramljak na neizmjernom strpljenju, razumijevanju, savjetima i pomoći u izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Valentinu Držaić na pomoći pri radu u laboratoriju tijekom istraživanja za diplomski rad te i svim drugim profesorima Agronomskog fakulteta na susretljivosti, pomoći i ukazanom znanju.

Zahvaljujem se svojim kolegama, prijateljima i roditeljima na neizmjernoj potpori koju su mi pružali sve ove godine

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. CILJ RADA | 2 |
| 2. PREGLED LITERATURE..... | 3 |
| 2.1. BROJ GOVEDA U SVIJETU I REPUBLICI HRVATSKOJ | 3 |
| 2.2. PROIZVODNJA I POTROŠNJA GOVEĐEG MESA U SVIJETU I REPUBLICI HRVATSKOJ..... | 4 |
| 2.3. PREGLED PASMINA | 5 |
| 2.3.1. Simentalska pasmina..... | 5 |
| 2.3.2. Holstein pasmina | 7 |
| 2.4. <i>EUROP</i> KLASIFIKACIJA I STUPANJ PREKRIVENOSTI MASNIM TKIVOM GOVEĐIH TRUPOVA | 10 |
| 2.5. POLIMORFIZAM TIROGLOBULIN GENA | 11 |
| 2.5.1. Povezanost polimorfizma TG gena s odlikama kvalitete trupova i mramoriranost mesa..... | 13 |
| 3. MATERIJAL I METODE..... | 15 |
| 3.1. KLANJE I KLAONIČKA OBRADA TRUPOVA | 15 |
| 3.2.1. Životinje korištene u istraživanju..... | 15 |
| 3.2.2. Obrada trupova na liniji klanja i klasiranja | 15 |
| 3.3.3. Statistička analiza..... | 15 |
| 3.2. GENETSKE ANALIZE | 16 |
| 3.2.1. Izolacija <i>DNK</i> iz tkiva..... | 16 |
| 3.2.2. Umnažanje <i>DNK</i> lančanom reakcijom polimeraze | 17 |
| 3.2.3. Restrikcija i očitavanje genotipova | 18 |
| 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA..... | 19 |
| 4.1. POLIMORFIZAM TG GENA..... | 19 |
| 4.2. UTJECAJ TG GENA NA ODLIKE KVALITETE TRUPOVA KRIŽANACA SIMENTALSKE I HOLŠTAJN PASMINE GOVEDA | 20 |

| | |
|---|----|
| 4.3. UTJECAJ SPOLA NA ODLIKE KVALITETE TRUPOVA KRIŽANACA SIMENTALSKE I HOLŠTAJN PASMINE GOVEDA | 23 |
| 4.4. UTJECAJ TG GENA I SPOLA NA ODLIKE KVALITETE TRUPOVA KRIŽANACA SIMENTALSKE I HOLŠTAJN PASMINE GOVEDA..... | 25 |
| 5. ZAKLJUČCI | 27 |
| 6. POPIS LITERATURE | 29 |
| ŽIVOTOPIS..... | 33 |

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Marija Jažo**, naslova

UTJECAJ POLIMORFIZMA *TG* GENA NA KVALITETU TRUPOVA I MRAMORIRANOST MESA KRIŽANACA SIMENTALSKE I HOLŠTAJN PASMINE GOVEDA

Govedarska proizvodnja teži zadovoljiti potrebe potrošača uzgajanjem i selekcijom pasmina protežirajući one genotipove koji će osigurati kvalitetno meso. Jedan od gena za kojeg se smatra da utječe na ekonomski važna svojstva mesa kao što su mekoća i zamašćenost (mramoriranost) je tiroglobulin (*TG*). Stoga je cilj rada bio utvrditi postojanje polimorfizma *TG* gena i njegov utjecaj na kvalitetu trupova i mramoriranost mesa križanaca simentalske i holštajn pasmine goveda. Polimorfizam *TG* gena utvrđen je u križanaca oba spola te su utvrđena samo dva genotipa (*CC* i *CT*), dok genotip *TT* nije utvrđen. U promatranom uzorku utvrđena je veća zastupljenost alelne varijante *C* i genotipa *CC*. Nije utvrđen statistički značajan utjecaj *TG* gena i spola na odlike kvalitete trupova križanaca simentalske i holštajn pasmine goveda. Interakcija *TG* gena i spola na odlike kvalitete trupova između muških i ženskih križanaca oba genotipa bila je statistički značajna za pokazatelje tjelesne mase kod klanja i dnevni prirast, mase toplih i hladnih polovica pri čemu su muški križanci ostvarili veće vrijednosti. Interakcija *TG* gena i spola križanaca na pokazatelje zamašćenosti trupova, klasiranje i mramoriranost nije bila statistički značajna.

Ključne riječi: križanci simentalske i holštajn pasmine, *TG* gen, polimorfizam, kvaliteta trupova

Summary

Of the master's thesis – student, **Marija Jažo** entitled

EFFECT OF *TG* GENE POLYMORPHISM ON CARCASS TRAITS AND MARBLING SCORE IN SIMMENTAL AND HOLSTEIN CROSSES CATTLE

Beef cattle production strives to meet the consumers' needs through breeding and selection of genotypes that will ensure meat quality. One of the genes, which affect economically important meat traits such as tenderness and fat content (marbling), is thyroglobulin (*TG*). Therefore, the aim of this study was to determine the existence of *TG* gene polymorphism and its influence on carcass quality and marbling score in Simmental and Holstein crossbreeds. *TG* gene polymorphism was found in crosses of both sexes and only *CC* and *CT* genotypes were identified, while the *TT* genotype was not determined. In the observed sample, a higher frequency of allelic variant *C* and genotype *CC* was found. Statistically significant influence of *TG* gene and sex on carcasses of Simmental and Holstein cattle breeds was not found. The interaction of *TG* gene and sex on the carcass quality between male and female crossbreds of both genotypes was statistically significant for live weight at slaughter and daily gain, hot and cold carcass weight, all of which were higher in male individuals. The interaction of *TG* gene and sex of crossbreds on fat content, *EUROP* classification and marbling score was not statistically significant.

Keywords: Simmental and Holstein crossbreeds, *TG* gene, polymorphism, carcass quality

1. UVOD

Govedarska proizvodnja je jedna od najvažnijih grana stočarstva koja rezultira biološki vrlo vrijednim animalnim namirnicama od kojih su najvažnije mlijeko i meso. Važnost govedarske proizvodnje očituje se u gospodarskim, socijalnim, kulturološkim i ekološkim komponentama. Sama proizvodnja ovisi o okolišnim uvjetima, raspoloživim površinama, raspoloživim genotipovima i tehnologiji (Ivanković 2017.). Osim mlijeka i mesa te prehrambenih namirnica, govedarska proizvodnja pruža vitalnost ruralnog prostora i bioraznolikost, pomaže u održavanju pašnjačkih površina, osigurava sirovinu za prerađivačku industriju te proizvodi stajski gnoj koji održava plodnost tla i njegovu strukturu.

Proizvodnja goveđeg mesa jedna je od bitnijih grana animalne proizvodnje u Republici Hrvatskoj koja se temelji na genotipu simentalske pasmine. U zadnja dva desetljeća proizvodnja goveđeg mesa u Republici Hrvatskoj bitno se smanjuje. Mogući razlozi su industrijalizacija proizvodnje, zapostavljanje manjih proizvodnih kapaciteta, napuštanje ruralnih sredina od strane mladih ljudi te cjenovna politika u gospodarstvu (Ivanković 2017.). Nastojeći maksimalno iskoristiti resurse, Republika Hrvatska kroz kombiniranu proizvodnju pokušava ostvariti dobar rezultat u proizvodnji i mlijeka i mesa koristeći samo jednu pasminu goveda.

U uzgoju domaćih životinja već odavno se provodi selekcija na svojstva od interesa, primarno na svojstva mliječnosti i mesnatosti. Proučavanjem gena i genetskih markera stječu se saznanja o proizvodnji mesa i mlijeka, prirastima, kemijskom sastavu mlijeka i mesa, masnih kiselina i slično. Velik dio proizvodnih svojstava je poligeneske prirode, odnosno na jedno svojstvo djeluje više gena, a učinak određenih varijanti alela na kvantitativna i kvalitativna svojstva se zbraja. Lokusi na kojima su prepoznate takve veze nazivaju se lokusima za kvantitativna svojstva (*engl. quantitative trait locus, QTL*). Tako je na goveđem autosomu 6 pronađeno 22.822 *QTL* povezanih sa svojstvima proizvodnje mlijeka (udio proteina, kapa-kazeina), proizvodnje mesa (randman, intramuskularna mast) i reproduktivnim osobinama (plodnost, proizvodni ciklus; CattleQTLdb, 2020.). U razumijevanju bioloških mehanizama proučava se više gena odgovornih za osobine kvalitete goveđih trupova koji direktno djeluju na kvalitetu mesa te u konačnici i na cijenu. Neki od proučavanih gena su miostatin (*MSTN*), diacilglicerol-0-transferaza 1 (*DGAT1*), tiroglobulin (*TG*), kalpain 1 (*CAPN1*), calpastatin (*CAST*), leptin (*LEP*), stearoil-CoA desateraza (*SCD*) i drugi. Uključivanjem genetike u uzgoj i proizvodnju otvara se mogućnost odabira grla boljih proizvodnih svojstava, a daljnjom selekcijom na svojstva od interesa postiže se genetski napredak.

1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je na uzorku muških i ženskih križanaca simentalske i holštajn pasmine goveda utvrditi:

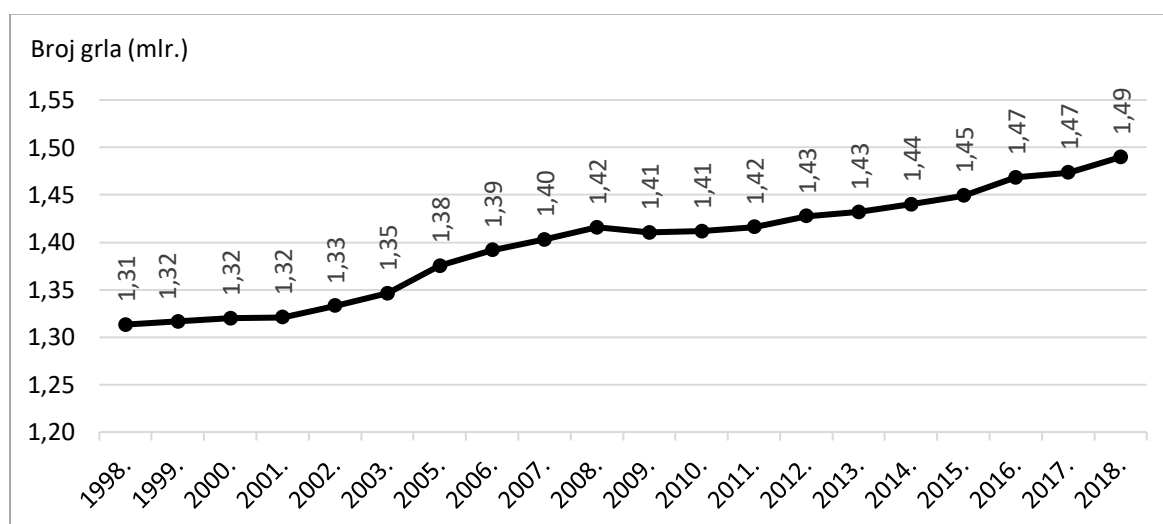
- i) polimorfizam *TG* gena,
- ii) frekvencije alela i genotipova *TG* gena,
- iii) odstupanje frekvencija genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže,
- iv) utjecaj polimorfizma *TG* gena na mramoriranost i odlike kvalitete trupova (zamašćenost, *EUROP* klasifikaciju).

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Broj goveda u svijetu i Republici Hrvatskoj

Brojno stanje goveda važan je podatak koji omogućava kontrolu tržišta, ponudu i potražnju na tržištu, a pod ingerencijom je Svjetske organizacije za hranu (*engl. Food and Agriculture Organisation, FAO*).

Brojno stanje goveda u svijetu u vremenskom razdoblju od 1998. do 2018. godine prikazan je u Grafikonu 2.1. (FAOSTAT 2020.). U dvadesetogodišnjem razdoblju razvidan je lagan, ali kontinuiran porast broja goveda od oko 10%. Prema podacima FAOSTAT za 2018. godinu broj goveda u svijetu iznosio je 1,49 milijardi. Neki od razloga sporog rasta broja goveda te sukladno, sporije proizvodnje su veća početna ulaganja u govedarsku proizvodnju, duži proces uzgoja i proizvodnje, prisutnost jeftinijeg mesa i cjenovno pristupačnijeg mesa i drugo.

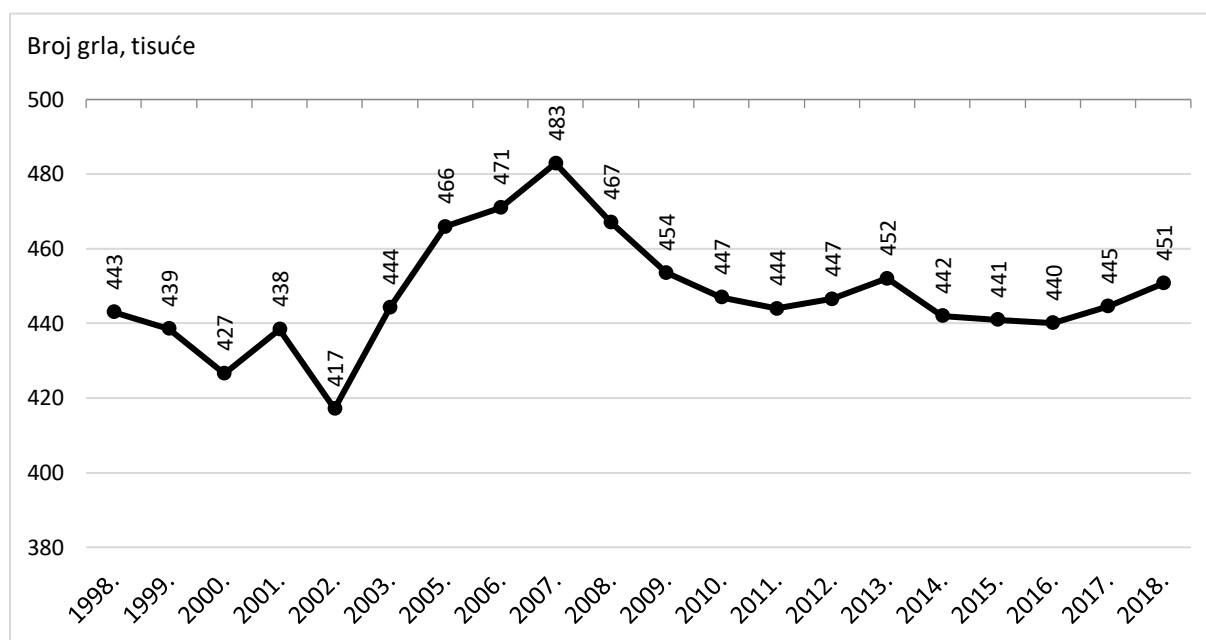


Grafikon 2.1 Trend brojnog stanja goveda u svijetu od 1998. do 2018. godine
Izvor: FAOSTAT (2020.)

Uvidom u brojno stanje goveda po kontinentima dominira Amerika (35,7%), Azija (31,9%), Afrika (19,7) dok Europa i Oceanije bilježe najmanji udio grla od 10% i 2,7%. Vodeće države u svijetu po broju goveda su Brazil (193,5 milijuna grla) i Indija (192,5 milijuna grla), zatim slijede Kina sa 82,5 milijuna grla, Argentina sa 52,5 milijuna grla i Etiopija sa 45 milijuna grla.

Trend smanjenja broja goveda prisutan je u Europskoj uniji koji u razdoblju od 1998. do 2008. iznosi 11,6%. Broj goveda u 28 zemalja Europske unije iznosi 88,4 milijuna goveda od kojih su najveći proizvođači Francuska (18,5 milijuna), Njemačka (19,5 milijuna) i Ujedinjeno Kraljevstvo (9,8 milijuna).

U zadnjih 20. godina brojno stanje goveda u Republici Hrvatskoj (RH) nije bilo konstantno. Naime, izmjenjivali su se pozitivni i negativni trendovi (Graf 2.2.). Od 1998. do 2002. broj goveda je fluktuirao, da bi slijedećih 5 godina bilježio kontinuirani rast za 13,6%. Najveći broj goveda zabilježen 2007. godine (483 tisuće) i tada počinje lagani pad brojnog stanja. Ponovni porast broja goveda u RH evidentiran je 2013. godine (za 5.445 grla u odnosu na 2012.). Zadnje dvije godine broj grla goveda je u laganom usponu i prema zadnjim podacima FAO, ukupan broj goveda u RH za 2018. godinu iznosi 450.757 grla.



Grafikon 2.2. Trend brojnog stanja goveda u Republici Hrvatskoj od 1998. do 2018. godine
Izvor: FAOSTAT (2020.)

2.2. Proizvodnja i potrošnja goveđeg mesa u svijetu i Republici Hrvatskoj

Meso je jedna od osnovnih namirnica u prehrani ljudi i predstavlja značajan dio poljoprivredne proizvodnje. Niz čimbenika djeluje na proizvodnju i potrošnju goveđeg mesa kao što je dostupnost sirovina (npr. teletine, junetine) i cijena istih, platežna moć i preferencije ljudi. Ovisno o potražnji i ekonomskoj razvijenosti područja u posljednjih 20 godina proizvodnja goveđeg mesa u svijetu u laganom je porastu za 24% (1998. – 54.273.427 tona, 2018. – 67.353.900 tona, FAOSTAT 2020.).

Najveći proizvođači goveđeg mesa su Amerika (48,2%), Azija (21,8%), Europa (15,8%) Afrika (9,9%) i Oceanija (4,3%). Nakon Amerike s godišnjem proizvodnjom od 12,2 tone, slijede Brazil (9,9 tone), Kina (5,8 tona) i Argentina (3,0 tone; FAOSTAT 2020.).

Europa bilježi negativan trend proizvodnje govedskog mesa (1998. – 12.566.738, 2018. – 10,617,906 tona). U 2018. godini u 28 zemalja članica ukupno je proizvedeno 7.949.846 tona goveđeg mesa, od čega je najveći proizvođač Francuska (1.436.358 tone), zatim Njemačka (1.123.452 tona), Ujedinjeno Kraljevstvo (922.000 tona) Italija (786.890 tona) i Španjolska (669.008 tona).

Meso predstavlja važan dio prehrane potrošača diljem svijeta čija potrošnja ovisi uglavnom o ekonomskoj razvijenosti zemlje. Generalno se može reći da potrošnja govedskog mesa ima pozitivan trend u svijetu. Prema podacima za 2014. godinu u razvijenim zemljama potrošnja goveđeg mesa iznosila je 76,2 kg, a u nešto manje razvijenim 33,4 kg (Grgić i Zrakić, 2015.). Isti autori navode da je najveći potrošač Kina koja troši oko četvrtinu ukupne svjetske proizvodnje.

Prema podacima FAOSTAT (2018.) proizvodnja goveđeg mesa u RH ima lagani porast u zadnjih 20 godina. Tada proizvodnja sa 25.691 tone (1998.) raste na 43.780 tona (2018.). Pozitivnom trendu uvelike pomaže veliki broj proizvođača *baby-beefa* koji proizvode oko 80% ukupnog tova (Grgić i Zrakić 2015.). No, unatoč zabilježenoj većoj proizvodnji, RH bilježi pad potrošnje govedskog mesa. Državni zavod za statistiku (2019.) navodi da je prosječna potrošnja goveđeg i telećeg mesa po članu kućanstva u RH 2017. godine iznosila 6,6 kg. Razlozi takvog negativnog trenda su višestruki. Kupovna moć potrošača pada i prednost se daje mesu prihvatljivije cijene (meso peradi, svinjetina), pojava bolesti goveđe spongiformne encefalopatije (*BSE*) i drugo što za posljedicu ima manju potrošnju goveđeg mesa (Ivanković 2017.).

2.3. Pregled pasmina

2.3.1. Simentalska pasmina

Simentalska pasmina goveda je pasmina kombiniranih proizvodnih svojstava pa je tako namijenjena proizvodnji mesa i mlijeka (Slika 2.1). Jedna je od najstarijih i najraširenijih pasmina u svijetu. Potječe iz malog područja doline rijeke Simme u Švicarskoj odakle i dolazi naziv Simentalac. Širenjem po Europi i svijetu simentalac dobiva i druge nazive po kojima je poznat. U Italiji je prisutan kao Pezzata Rossa, u Francuskoj kao Montbeliard i Abonance, a u Njemačkoj, Austriji i Švicarskoj kao Fleckvieh. Simentalska pasmina proširila se po cijelom svijetu te se danas može naći na svim kontinentima.

Simentalsko govedo je srednje zrelo govedo, umjerene veličine okvira i odlikuje se dobrom mesnatosti i mliječnosti. Odrasli bikovi mogu ostvariti težinu do 1.300 kg i visinu u grebenu od 155 cm. Krave su u grebenu nešto niže sa 130-140 cm i dostižu težinu 600-750 kg. Tijelo simentalca prekriveno je crveno-bijelim ili žuto-bijelim poljima dok su glava i donji dijelovi nogu bijeli. Prosječni dnevni prirast mladih bikova je od 1.200 do 1.400 grama. Porodna masa teladi je 38-43 kg, a randman ili iskoristivost trupa iznosi oko 60%. Simentalac se odavno koristio u svrhu proizvodnje mlijeka, mesa i kao radna životinja, ali sada je selekcija

usmjerena isključivo na proizvodnju mlijeka i mesa. U proizvodnji mlijeka simentalac može ostvariti i do 7. 000 kg mlijeka, a njegovo meso je poželjne boje, blage mramoriranosti, mekano i sočno (Ivanković 2017.). Simentalac se koristi uglavnom u kombiniranoj proizvodnji (mlijeko-meso), a pogodan je i za intenzivne i umjereno intenzivne sustave proizvodnje govedskog mesa.



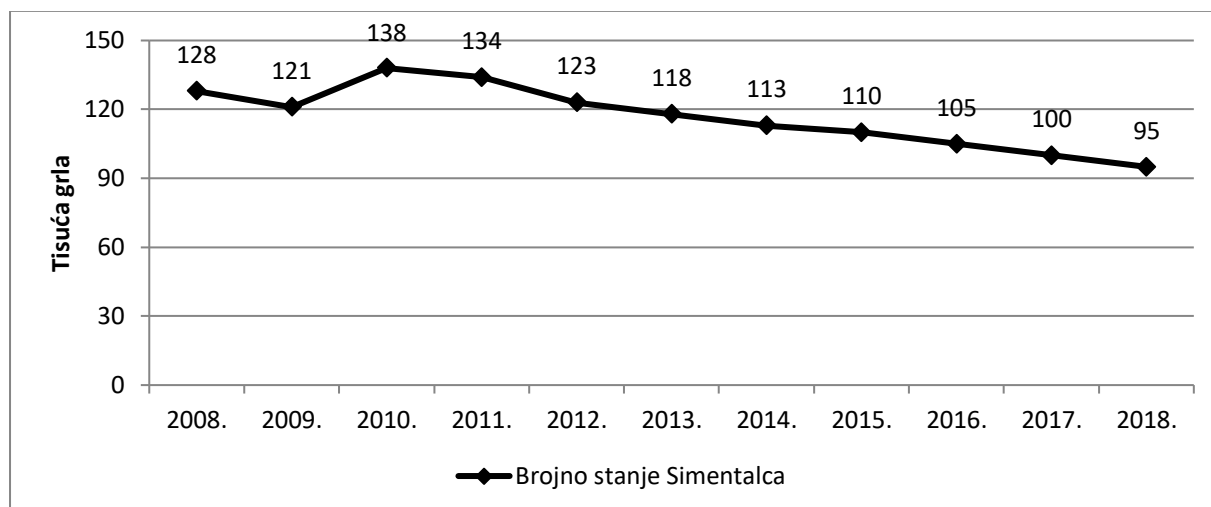
Slika 2.1. Simentalsko govedo

Izvor: Ivanković A.

Uzgoj simentalca u RH započinje uvozom 1 bika i 11 krava 1885. godine na posjed vlastelina u Kosnici, a nakon njega uvoz nastavlja Poljoprivredna škola u Križevcima. S vremenom je interes za govedo simentalke pasmine sve više rastao zbog njegove dobre sposobnosti prilagodbe i dobrih proizvodnih osobina (brži rast, veća muznost i tovnost). Uzgoj simentalca je tako privukao pažnju stočara i krenuo se širiti na ostala područja Hrvatske (Barać i sur. 2013.). U Hrvatskoj se proizvodnja mesa provodi dijelom na obiteljskim farmama, a dijelom na specijaliziranim jedinicama za tov. Bikovi su u tovu do starosti od 17 do 29 mjeseci (550-600 kg), a tov junica je nešto kraći i traje do 14 mjeseci (400-450 kg) jer ranije završavaju intenzivni rast. Zadnjih godina dolazi do promjena u tehnologiji tova gdje se povećava završna težina utovljenih grla što za posljedicu ima veću proizvodnju govedskog mesa s istim brojem teladi za tov (Jakopović 2007.).

Brojno stanje simentalca u RH prije 10 godina bilo je 128,059 grla i u ukupnoj populaciji goveda sudjelovao je sa 69%. Prema podacima iz 2018. godine taj broj se smanjio za 8% te

sada u ukupnoj populaciji goveda u RH sudjeluje sa 61%. Trend brojnog stanja simentalca u Republici Hrvatskoj prikazan je u Grafikonu 2.3..



Grafikon 2.3. Brojno stanje Simentalca u Republici Hrvatskoj od 2008. do 2018. godine
Izvor: HPA (2008.-2018.)

2.3.2. Holstein pasmina

Holstein pasmina goveda je najmlječnija pasmina na svijetu, a ujedno i najrasprostranjenija (Slika2.2.). Podrijetlo ove pasmine je područje današnje Nizozemske iz provincija North Holland i Friesland po čemu dobiva naziv holštajn-frizijsko govedo. Holstein je nastao križanjem crnih i bijelih jedinki i daljnjom selekcijom dobivena je pasmina koja dobro koristi velike pašnjake, dobre je prilagodljivosti, dobre plodnosti, vanjštine te izrazito visoke mliječnosti. Interes za ovu pasminu raste pa se holštajn počinje uvoziti na prostore SAD-a te se tamo sustavno uzgaja. Pojavom bolesti u Europi uvozi se američki tip holštajna i pretapanjem populacije s frizijcem nastaje današnji holštajnski tip goveda. Ovaj tip dominira u Europi kao mliječna pasmina i predstavlja osnovu mljekarske proizvodnje.

Holstein govedo je srednje zrelo govedo vrlo prepoznatljive vanjštine. To je pasmina velikog okvira crno-bijelog dlačnog pokrivača sa bijelim repom i donjim dijelovima nogu. Može se javiti i crveno-bijeli tip (Red Holstein), ali samo u 1% slučajeva. Visina grebena kod krava je oko 145 cm i mogu doseći masu od 650 do 700 kg. Funkcionalno, vrlo dobro, muzno vime omogućuje visoke dnevne priraste kroz mnogo laktacija. Proizvodni kapacitet holštajn krava iznosi od 7.000 do 10.000 litara godišnje, dok u nekim zemljama (SAD, Kanada) postoje jedinke koje premašuju navedenu proizvodnju. Da bi se ovakva proizvodnja ostvarila najprije treba imati jedinku dobre prilagodljivosti s velikom sposobnosti apsorpcije hrane, stabilnog zdravlja, dobre plodnosti i dobre vanjštine kojoj treba osigurati odgovarajuće uvjete držanja i izbalansiranu hranidbu. Takav način osigurat će nam profitabilnu dugovječnu kravu s visokim prinosom. Proizvodni vijek holštajn krave je oko četiri godine.



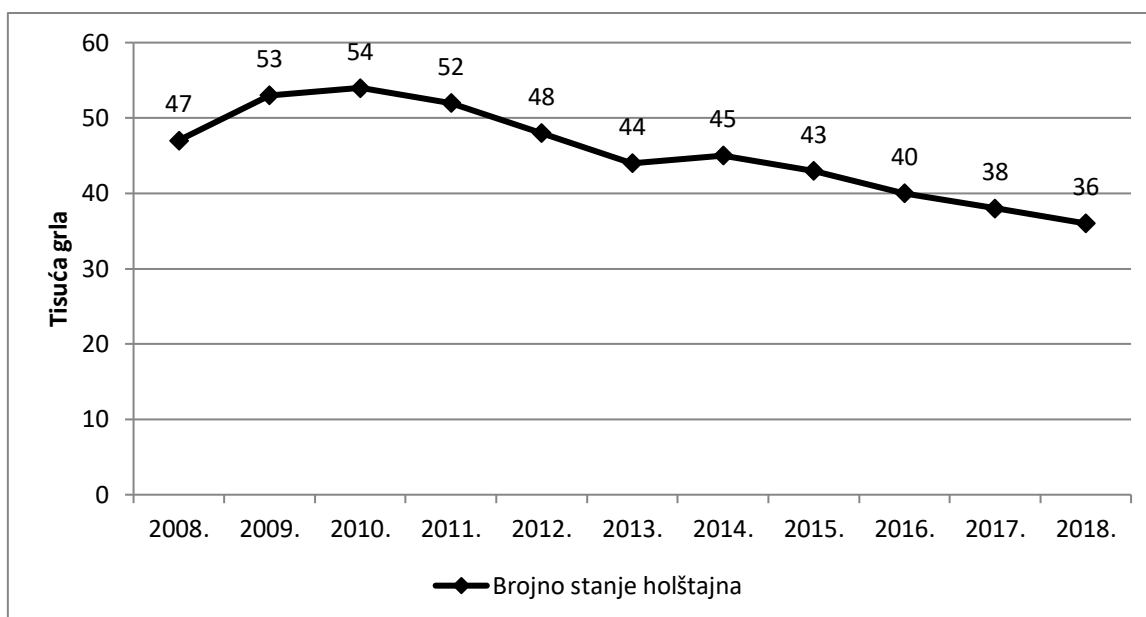
Slika 2.2. Govedo holštajnko frizijske pasmine

Izvor: Ivanković A.

Krave holštajn pasmine vrlo su osjetljive jedinke jer zbog visoke selekcije na mliječnost ostala selekcijska svojstva su potisnuta. Propusti proizvođača i stres uzrokuju probleme u obliku bolesti ili smanjene proizvodnje. Mogu se javiti problemi jalovosti, slabije plodnosti, oboljenje vimena (mastitis), oboljenje nogu. Pojava problema rezultira izlučivanjem krave iz proizvodnje. S druge strane, u proizvodnji mesa holštajn govedo je od sekundarnog interesa jer ostvaruje niže priraste, slabu konverziju hrane te je prisutno ranije zamašćivanje.

U Republici Hrvatskoj su se holštajn krave uzgajale na velikim mliječnim farmama. Nakon rata dosta farmi je privatizirano ili su u stečaju pa se sve više holštajn krava uzgaja na obiteljskim gospodarstvima. Zbog dobre proizvodnje počinje se raditi na uzgojno-selekcijskom programu. Brojno stanje se povećavalo te sama proizvodnja mlijeka po kravi koja je bila veća na farmama nego na obiteljskim gospodarstvima zbog bolje tehnologije proizvodnje, bolje hranidbe i boljeg stručnog kadra (Haluška i Rimac 2005).

Prema podacima HPA (2018.) holštajn goveda su u ukupnoj populaciji goveda RH sudjelovale sa 23%. Navedeno je manje nego u razdoblju prije 10 godina kada je njihov udio iznosio 25%. Brojno stanje holštajn goveda u RH prikazuje Grafikon 2.4..



Grafikon 2.4. Brojno stanje holštajna u Republici Hrvatskoj od 2008. do 2018. godine
Izvor: HPA (2008.-2018.)

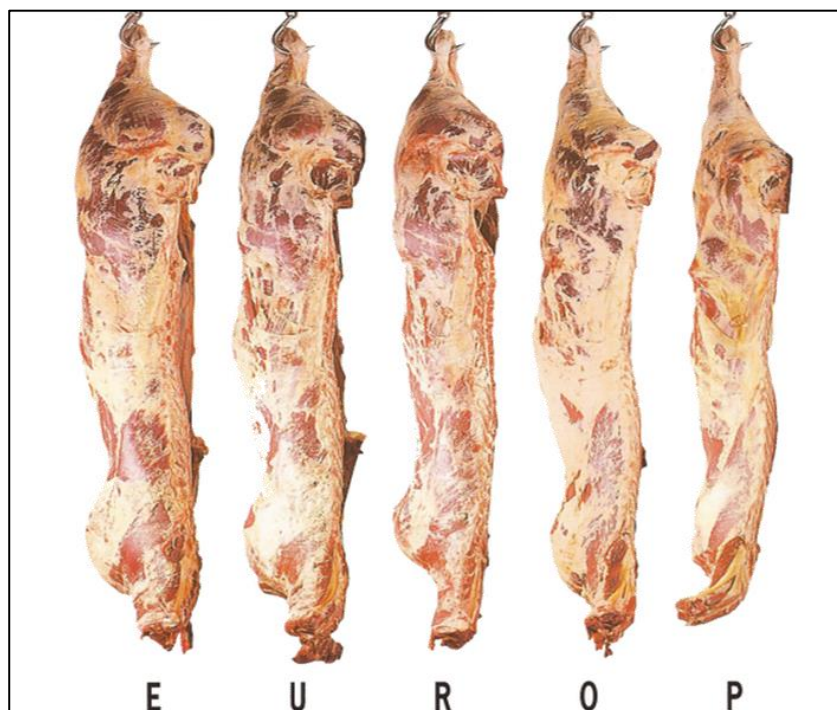
2.4. *EUROP* klasifikacija i stupanj prekrivenosti masnim tkivom goveđih trupova

Određivanje kakvoće goveđih trupova jedan je od preduvjeta stavljanja mesa na tržište i njegove sljedivosti. Kategorija goveđih trupova određuje se prema dobnoj skupini i spolu na liniji klanja, a zatim se razvrstava u određenu *EUROP* klasu ovisno o konformaciji trupa i razvijenosti mišića na polovicama, odnosno razred zamašćenja ovisno o stupnju prekrivenosti trupova i polovica masnim tkivom. Goveđi trupovi prema Uredbi komisije (EZ) br. 1249/2008 razvrstavaju se u 5 klasa (*E, U, R, O, P*) kako je prikazano Tablicom 2.1. i Slikom 2.3.. Oznaka *E* označava izvrsnu konformaciju goveđeg trpa, a *P* slabu (najlošiju) konformaciju.

Tablica 2.1. *EUROP* klasifikacija goveđih trupova

| | <i>E</i> <i>Izvrсна</i> | <i>U</i> <i>Vrlo dobra</i> | <i>R</i> <i>Dobra</i> | <i>O</i> <i>Osrednja</i> | <i>P</i> <i>Slaba</i> |
|-----------------|--------------------------------------|---------------------------------|---|--|---------------------------|
| But | Visoko zaobljeni | Zaobljen | Dobro razvijen | Srednje razvijen do nerazvijen | Slabo razvijen |
| Leđa | Široka i vrlo popunjena; do lopatica | Široka i popunjena; do lopatica | I dalje popunjena; no manje široka prema lopatici | Prosječna popunjenost do nedostatka popunjenosti | Uska s izbočenim kostima |
| Lopatica | Visoko zaobljena | Zaobljena | Osrednje dobro razvijena | Prosječni razvoj do gotovo ravna | Ravna s izbočenim kostima |

Izvor: Uredba komisije (EZ) br. 1249/2008



Slika 2.3. *EUROP* klasifikacija goveđih trupova

Izvor: <http://lounckemarcel.weebly.com/beef--vita.html#sthash.2xjWd9AU.dpbs>

Stupanj prekrivenosti goveđih trupova masnim tkivom (zamašćenost) iskazuje se numeracijom od 1 do 5 kao što je navedeno u Tablici 2.2. i Slici 2.4.. Stupanj 1 označava vrlo slabu, a stupanj 5 vrlo jaku prekrivenost masnim tkivom.

Tablica 2.2. Stupanj prekrivenosti masnim tkivom goveđih polovica

| Stupanj prekrivenosti masnim tkivom | | Opis prekrivenosti masnim tkivom |
|-------------------------------------|--------|---|
| Naziv | Oznaka | |
| Vrlo slaba | 1 | Bez naslaga masnog tkiva u prsnoj šupljini |
| Slaba | 2 | Mišići su jasno vidljivi u prsnoj šupljini između rebara |
| Srednja | 3 | Mišići su i dalje vidljivi u prsnoj šupljini između rebara |
| Jaka | 4 | Naslage masnog tkiva na butu si izrazite. Mišići u prsnoj šupljini između rebara mogu biti prekriveni masnim tkivom |
| Vrlo jaka | 5 | But je gotovo potpuno prekriven masnim tkivom tako da se spojevi masti više ne vide jasno. Mišići u prsnoj šupljini između rebara prekriveni su masnim tkivom |

Izvor: Uredba komisije (EZ) br. 1249/2008



Izvor: Ivanković i Kos (2017.)

Slika 2.4. Prikaz prekrivenosti trupa masnim tkivom

Sustav klasiranja goveđih trupova u RH provodi Ministarstvo poljoprivrede sukladno Pravilniku o razvrstavanju i označavanju goveđih, svinjskih i ovčjih trupova te označavanju mesa koje potječe od goveda starih manje od 12 mjeseci (NN 71/18). Postupak klasiranja obavljaju osposobljenih klasifikatori u klaonicama ovlaštenih od Ministarstva poljoprivrede. Prema dobivenim vrijednostima polovica se označava propisanim oznakama (naljepnicama). Naljepnica sadržava podatke o klaonici, klanju (datum klanja, država klanja, težina klaonički obrađenog trupa, lasa, kategorija, stupanj zamašćenosti). Trup treba biti označen s naljepnicama postavljenim na vanjskoj strani trupa.

2.5. Polimorfizam tiroglobulin gena

Polimorfizam označava pojavu više od jednog alela na nekom genskom lokusu što rezultira genetskim varijacijama unutar organizma. Određene ekspresije fenotipova dovode

se u usku vezu s genotipom, odnosno frekvencijama određenih alelnih varijanti. Neki od gena u goveđem genomu koji se dovode u vezu s kvalitativnim ili kvantitativnim osobinama su leptin (*LEP*), kalpastatin (*CAST*), kalpain 1 (*CAPN1*), diacilglicerol-transferaza 1 (*DGAT1*), tiroglobulin (*TG*).

Tiroglobulin (*TG*) je glikoproteinski prekursor hormona štitnjače koji ima utjecaj na lipidni metabolizam. Smješten je na centromernoj regiji goveđeg autosoma 14 (*engl. Bos taurus Autosom, BTA*) na lokusu NC_037341 i veličine je 306.724 parova baza (pb; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_037341.1?report=genbank&from=8182105&to=8488828&strand=true, Slika 2.5.). Tiroglobulin se sintetizira u štitnoj žlijezdi (stanice tireociti) i sudjeluje u sintezi hormona štitnjače trijodtironin (*T3*) i tiroksina (*T4*). Oni igraju jednu od glavnih uloga u diferencijaciji, rastu, metabolizmu i fiziološkom radu svih tkiva, pa tako i adipocita, odnosno masnog tkiva.



Slika 2.5. Pozicija *TG* gena na 14. kromosomu goveda u blizini drugih gena; *N-my downstream regulated 1* (*NDRG1*); *cellular communication network factor 4* (*CCN4*); *src like adaptor* (*SLA*); *PHD finger protein 20 like 1* (*PHF10L1*); *transmembrane protein 71* (*TMEM71*)
Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/280706>

Barendse (1999.) prvi je definirao polimorfizam *TG* gena na poziciji 422 tranzicijom aminokiseline citozin (*C* alel) u timin (*T* alel) u proteinskoj sekvenci. Polimorfizam je naknadno i patentirao pod pristupnim brojem X05380 u banci gena te se koristi u selekciji potpomognutoj markerima (*engl. Marker Assisted Selection, MAS*) za osobine povećanja kvalitete mesa i stupnja mramoriranosti. Daljnja istraživanja utjecaja *TG* gena na karakteristike kvalitete trupova proveli su Shin i Chung (2007.) na populaciji izvornih korejskih pasmina goveda. Isti autori utvrdili su prisutnost već spomenute C422T mutacije, dok su dvije mutacije bile nove: C→T i A→G na pozicijama 257 i 335 (C257T, A335G). SNP podaci navedenih polimorfizama zavedeni su u banci gena pod pristupnim brojem AY615525. Šest novih mutacija u sekvenci dužine 709 parova baza *TG* gena kod mesnih pasmina goveda utvrdili su Gan i sur. (2008., pristupni broj u banci gena EU591737). Sekvenca od interesa sadržavala je točkaste polimorfizme (*engl. single nucleotide polymorphism, SNP*) A/T na poziciji 110, G/C na poziciji 133, G/A na poziciji 156, C/T na poziciji 220, A/G na poziciji 351 i A/C na poziciji 506. Od navedenih četiri *SNP* (*G133C*, *G156A*, *C220T* i *A506C*) nalaze se u tzv. *linkage equilibriumu* ($r^2 = 1$), odnosno odsječak DNK unutar kojeg su njihovi SNP nasljeđuje se zajedno (kao jedna

¹ r^2 – mjera koja označava jačinu povezanosti i postojanje *linkage equilibriuma* između SNP-a (0 = nema povezanosti, 1 = totalna povezanost)

jedinica). Zhang i sur. (2015.) na kineskim pasminama goveda utvrđuju prisutnost 4 nove mutacije (*T1355C*, *G1356A*, *T1531C* i *C1548A*) na 5' bočnoj regiji *TG* gena unutar sekvence veličine 785 parova baza. Distribucija frekvencija genotipova bila je neravnomjerna između pasmina te su frekvencije genotipova *CC* (*T1355C*), *AA* (*G1356A*) i *TT* (*T1531C*) bile vrlo niske u istraživanom uzorku, dok genotip *AA* polimorfizma *C1548A* nije otkriven.

2.5.1. Povezanost polimorfizma *TG* gena s odlikama kvalitete trupova i mramoriranost mesa

Polimorfizam *TG* gena s dovodi se u vezu nekoliko ekonomski važnih svojstava kvalitete trupova i mramoriranosti mesa u različitim pasmina goveda. Tako su Barendse i sur. (2004.) i Burrell i sur. (2004.) utvrdili utjecaj polimorfizam *C422T* *TG* gena na svojstvo mramoriranosti kod različitih pasmina goveda. Jedinke genotipa *TT* imale su veći stupanj mramoriranosti u odnosu na jedinke *CC* genotipa. Slično, Thaller i sur. (2003.) utvrdili su značajan utjecaj polimorfizma *TG* gena na mramoriranost mišića *musculus longissimus dorsi* u populaciji njemačkog holštajna, ali ne i u populaciji šarole (Charolais) goveda. Do istih zaključaka došli su Anton i sur. (2008a.) koji navode da su bikovi holštajnsko-frizijske pasmine *TT* genotipa imali najveći udio masti u *musculus longissimus dorsi* te da su razlike između *TT* i *CC* genotipova bile statistički značajne. Značajan utjecaj polimorfizma *C422T* *TG* gena s mramoriranostću mesa u populaciji korejskih goveda utvrdili su Shin i Chung (2007.). No, u suprotnosti s prijašnjim istraživanjima, meso jedinki *CC* i *CT* genotipa imalo je izraženiju mramoriranost u odnosu na meso jedinki *TT* genotipa. Točkasti polimorfizmi unutar *TG* gena, osim na svojstvo mramoriranosti imali su značajan neka druga svojstva kvalitete trupa goveda. Casas i sur. (2005.) utvrđuju značajan učinak na debljinu masnog tkiva (*TT* genotip) i veću zamašćenost mišića slabina (*CC* genotip)

Nove polimorfizme unutar sekvence *TG* gena pronašli su Casas i sur. (2007.), Gan i sur. (2008.) i Zhang i sur. (2015.). Iako Casas i sur. (2007.) nisu utvrdili povezanost polimorfizama *TG* gena s mramoriranošću mesa kod 15 pasmina goveda, jedino je kod Wagyu pasmine polimorfizam (genotip *TT*) imao značajan utjecaj. Gan i sur. (2008.) SNP polimorfizme *G133C*, *G156A*, *C220T* i *A506C* dovode u vezu s mramoriranošću mesa u osam različitih pasmina goveda pri čemu je genotip *CC* odgovoran za jaču mramoriranost mesa. Zhang i sur. (2015.) na uzorku od 237 jedinki različitih pasmina (*Angus*, *Charolais*, *Luxi*, *Qinchuan*, *Hereford*, *Limousin*, *Simmental* i *Jinnan*) utvrdili su 4 polimorfizma *G275A*, *G277C*, *G280A* i *C281G* koji su imali značajan utjecaj na prosječan dnevni prirast. Isti istraživači navode da nije bilo utjecaja polimorfizama na težinu trupa, randman, mramoriranost i debljinu leđne slanine.

Mnoga provedena istraživanja SNP polimorfizama *TG* gena i utjecaja na kvantitativne i/ili kvalitativne osobine trupa goveda nisu našla povezanost. Proučavajući debljinu leđne slanine u komercijalnim linijama *Bos taurus* goveda More i sur. (2003.) nisu utvrdili statistički značajnu povezanost genotipova i polimorfizma *TG* gena. Nadalje, u pasmini Brahma goveda koji pripadaju skupini *Bos indicus*, Casas i sur. (2005.) nisu pronašli vezu između veće mramoriranosti i mekoće mesa i *TG* gena. Nadalje, ni Fortes i sur. (2009.) ne dovode u direktnu

vezu polimorfizam *TG* gena s debljinom masnog tkiva, ukupnim lipidima, sadržajem masti u rebrenom isječku i svojstvom otpora mesa na sječenje. Jedan od razloga koji autori navode je malen broj homozigotnih jedinki *TT* genotipa te sukladno i malo fenotipskih podataka na osnovi kojih bi se mogao izvesti konkretan zaključak. Istraživanja provedena na izvornoj populaciji goveda u Irskoj o povezanosti *TG* gena i sadržaja intramuskularne masti u mišićima (*musculus longissimus thoracis et lumborum* i *musculus semimembranosus*) nisu dala statistički značajne rezultate. Neučinkovitost uporabe *TG* gena kao markera u selekciji goveda u Brazilu navode Dutra de Carvalho i sur. (2012.). Naime, polimorfizam *TG* gena nije se pokazao značajnim za klaonička svojstva (masa klanja, masa toplih polovica, debljina masnog tkiva i rebrenog isječka, svojstvo otpora mesa na sječenje) i mramoriranost. Ni utjecaj polimorfizma *TG* gena na toвне osobine također nije utvrđen (Ardicli i sur. 2019.). Isti autori nisu našli značajnu povezanost SNP *TG* gena s osobinama duljine trajanja tova, završnom tjelesnom masom, unosom suhe tvari i prosječnim dnevnim prirastom u populaciji holštajn bikova.

Tovni i klaonički pokazatelji, zamašćenost trupova, mramoriranost mesa i drugi stvaraju sliku o kvaliteti trupa što je jedno od glavnih obilježja mesne industrije. S obzirom na navedeno u *TG* gen može se smatrati genom kandidatom za poboljšanje odlika kvalitete trupova. Za potrebe donošenja znanstveno utemeljene uloge polimorfizma *TG* gena potrebno je uključiti što veći broj jedinki različitih pasmina u istraživanje. Također, u procjeni kompleksnih osobina kao što su osobine rasta i tova preporuča se uključivanje i djelovanje epigenetskih čimbenika.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Klanje i klaonička obrada trupova

3.2.1. Životinje korištene u istraživanju

Istraživanje je provedeno na 25 križanaca (10 bikova i 15 junica) simentske i holštajn pasmine goveda namijenjenih tovu. Za vrijeme istraživanja sva grla boravila su na istoj farmi i imala su iste uvjete smještaja i hranidbe. Grla su držana u unutarnjim boksovima u dubokoj stelji. Hranidba se sastojala od kompletnog obroka sastavljenog od kukuruzne silaže, visoko vlažnog kukuruza, koncentrata i slame davanog jednokratno na krmni stol. Voda je bila dostupna *ad libitum*.

3.2.2. Obrada trupova na liniji klanja i klasiranja

Tjelesna masa određena je po rođenju vaganjem na stočnoj vagi. Poštujući zakonsku regulativu koja je tada bila na snazi (Pravilnik o zaštiti životinja pri klanju ili usmrćivanju, NN 116/05) životinje su prevezene u ovlaštenu klaonicu i zaklane po standardnoj proceduri. Životinje su omamljivane pneumatskim pištoljem (Schermer) s penetrirajućim klinom, slijedilo je presijecanje velikih vratnih vena (*v. jugularis*), iskrvarenje u visećem položaju, dekapitacija i evisceracija. Potom je uslijedila obrada trupova prema zakonskoj regulativi tj. Pravilniku o kakvoći govedih trupova i polovica na liniji klanja (NN 2/2009). Neposredno prije i nakon klanja jedinkama je utvrđena tjelesna masa. Masa toplih polovica (bez bubrega i bubrežnog loja) izmjerena je odmah po klanju. Masa hladnih polovica izmjerena je nakon 24 sata hlađenja polovica na + 4°C. Ovlašteni klasifikator ocijenio je trupove prema *EUROP* sustavu klasifikacije kako slijedi: *E*-izvrsna, *U*-vrlo dobra, *R*-dobra, *O*-osrednja i *P*-slaba. Također, klasifikator je ocijenio trupove ovisno od stupnja prekrivenosti masnim tkivom (1-vrlo slaba, 2-slaba, 3-srednja, 4-jaka, 5-vrlo jaka). Neto dnevni prirast izračunat je po formuli = $((\text{masa hladnih polovica} - (\text{porodna masa} \times 0,54^2)) / \text{dob} \times 1000)$. Na presjeku *musculus longissimus dorsi* (između 6. i 7. rebra) procijenjena je mramoriranost mesa tzv. australskim modelom (<https://meatnbone.com/blogs/the-clever-cleaver/meat-beef-grading-system-understanding>). Bodovna skala imala je raspon od 1 do 9 pri čemu 1 označava vrlo malu mramoriranost, a 9 vrlo veliku mramoriranost. Od odsječka *MLD* uzet je komadić tkiva i pohranjen na -20°C do provođenja genetskih analiza.

3.3.3. Statistička analiza

Određivanje genetskih parametara (frekvencija alela i genotipova) provedeno je statističkim programom R (R Core Team 2008.) koristeći paket HardyWeinberg. Korištenjem

² 0,54 je koeficijent klaoničkog randmana teleta za izračun neto dnevnog prirasta

istog paketa hi-kvadrat testom (χ^2) izračunato je odstupanje frekvencije alela i genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže.

Dobiveni podatci statistički su obrađeni primjenom statističkog programa SAS 9.4 (SAS 2019.). Opisna statistika porodne mase, starosti kod klanja, tjelesne mase kod klanja, prirasta, klase, stupnja zamašćenosti, mase tople polovice, mase hladne polovice i stupnja mramariranosti provedena je primjenom procedure MEANS. Utjecaj genotipa (CC : CT) i spola (muški : ženski) te njihove interakcije na navedene pokazatelje analiziran je GLM procedurom. U statističkom modelu za utvrđivanje utjecaja genotipa i spola te njihove interakcije na tjelesnu masu kod klanja, prirast, klasu, stupanj zamašćenosti, masu tople polovice, masu hladne polovice i stupanj mramariranosti, u modelu je dob junadi korištena kao kovarijabla. Kod procjene utjecaja spola na navedene pokazatelje uz dob je kao kovarijabla korišten genotip, dok je kod procjene utjecaja genotipa uz dob, kao kovarijabla korišten i spol. Statistički model za procjenu utjecaja genotipa, spola i njihove interakcije bio je sljedeći:

$$Y_{ikl} = \mu + s_i + g_{ik} + (sd)_{il} + e_{ikl}$$

Y_{ikl} – izmjereno svojstvo

μ – ukupna srednja vrijednost svojstva

s_i – utjecaj i -tog spola (i – muški, ženski)

g_{ik} – utjecaj k -tog ($k = TG$) lokusa i i -tog spola

sd_{il} – interakcija spola i genotipa

e_{ikl} – neprotumačeni utjecaj

Dobivene vrijednosti su izražene kao LSMEAN \pm SE (prosjeak sume najmanjih kvadrata \pm standardna greška).

3.2. Genetske analize

3.2.1. Izolacija DNK iz tkiva

Izolacija DNK iz uzorka tkiva *musculus longissimus dorsi* (MLD) provedena je korištenjem kita GenElute™ Mammalian Genomic DNA (Sigma Aldrich) prema preporuci proizvođača. Uzorci MLD odmrznuti na sobnoj temperaturi i oko 25 mg uzorka stavljeno je u tube od 1,5 mL. U tube s uzorcima tkiva dodano je 180 μ L Lysis otopine T i 20 μ L proteinaze nakon koji su potakli razgradnju tkiva. Za kompletnu razgradnju tuba s uzorcima stavljena je na inkubaciju (70°C 10 minuta (min)). U cilju dobivanja homogene smjese i dodano je 200 μ L otopine za liziranje C (*lysis solution C*) i miješano oko 30 sekundi na vorteksu. Zatim je dodano 200 μ L hladnog 96% etanola i smjesa je 10 sekundi miješana na vorteksu. Rezultat je dobivena smjesa ili lizat.

Priprema kolona počinje s dodavanjem 500 μ L otopine za ispiranje u tubice s kolonama od 2 mL (GenElute Miniprep Column). Potom se dodaje sadržaj lizata koji se zatim centrifugira na 6.000 rcf u trajanju od 1 minute. Slijede dva ispiranja prema uputama proizvođača s 500 μ L

otopine za ispiranje (*wash solution*), nakon čega je uslijedilo centrifugiranje 1 min na 6.600 rcf. Kolona su prebačene u čiste 2,0 mL tubice. Nakon drugog ispiranja otopinom centrifugiranje kolona trajalo je 3 min na 14.000 rcf. Slijedeći korak je otapanje DNK koje je provedeno dodatkom 80 μ L otopine za otapanje DNK (*elution solution*) u svaku kolonu i inkubacijom (5 min na sobnoj temperaturi) te centrifugiranjem kolona (1 min, 6.600 rcf). Postupak je ponovljen u svrhu dobivanja veće količine DNK. Nakon drugog otapanja u tubi je ostala čista DNK. Za procjenu kvalitete izolirane DNK korištena je metoda gel elektroforeze na 1% agaroznom gelu. Izolirana DNK potom je pohranjena u zamrzivaču na temperaturi od -20°C .

3.2.2. Umnažanje DNK lančanom reakcijom polimeraze

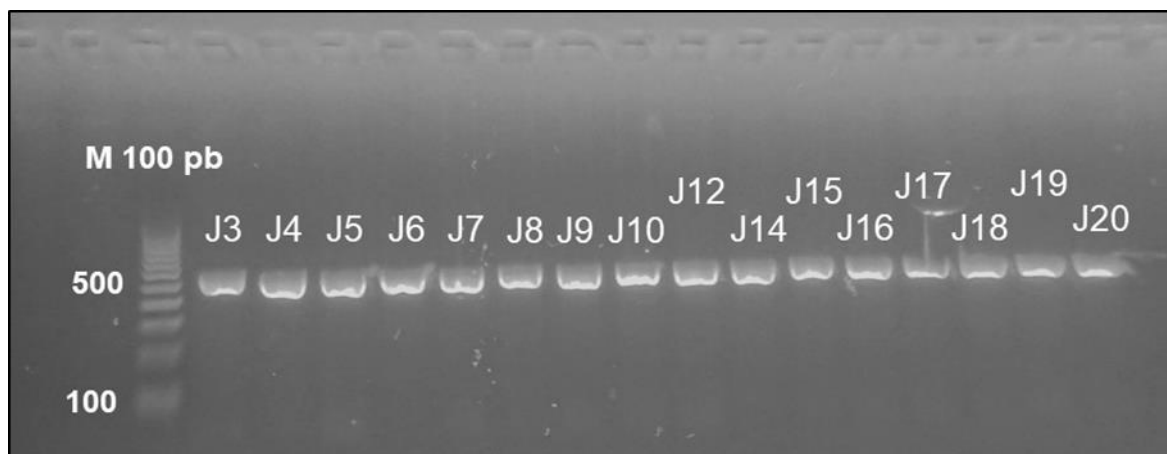
Lančana reakcija polimeraze (*engl. Polymerase Chain Reaction, PCR*) predstavlja djelotvornu metodu kojom se sekvenca od interesa može umnožiti i do bilijun kopija. Protokol za PCR reakciju usvojen je od Thaller i sur. (2003.) i optimiziran po potrebi. Za provođenje PCR reakcije *TG* gena korišten je Takara Emerald Amp[®] MAX HS PCR Master Mix prema uputama proizvođača. Reakcijska smjesa sastojala se od:

- 7,5 μ L Emerald Amp[®] MAX HS PCR Master Mix
- 5,4 μ L H₂O slobodne od nukleaza
- 0,45 μ L *TG* začetnice prema naprijed (*engl. forward*) 10 μ M
5'- GGG GAT GAC TAC GAG TAT GAC TG -3'
- 0,45 μ L *TG* začetnice prema natrag (*engl. reverse*) 10 μ M
3'- GTG AAA ATC TTG TGG AGG CTG TA -5'
- 1,2 μ L DNK.

Ukupan volumen reakcijske smjese bio je 15 μ L.

Na mastercycleru je obavljeno umnažanje željene sekvence prema optimiziranim protokolima: reakcija aktivacije polimeraze ($98^{\circ}\text{C}/3$ min), denaturacija ($98^{\circ}\text{C}/10$ sekundi), priliaganje začetnica ($63,5^{\circ}/30$ sekundi), produljenje lanca DNK ($72^{\circ}\text{C}/50$ sekundi), krajnje produljenje umnožene sekvence DNK ($72^{\circ}\text{C}/5$ min) i hlađenje ($4^{\circ}\text{C}/\infty$). Procesi umnažanja ciljane sekvence *TG* gena provedeno je kroz 35 ciklusa.

Kvaliteta umnažanja ciljane sekvence *TG* gena provjerena je na 1% gelu agaroze (0,75 g agaroze i 75 mL 1x TBE pufera u koje je dodano 1 μ L etidijevog bromida). U jažice pripremljenog gela stavljeno je 5 μ L produkata restriksijske razgradnje te provedena elektroforeza na 80 V u trajanju 80 min. Uzorci su vizualizirani pod UV svjetlom na uređaju transiluminatoru (Slika 3.1.).

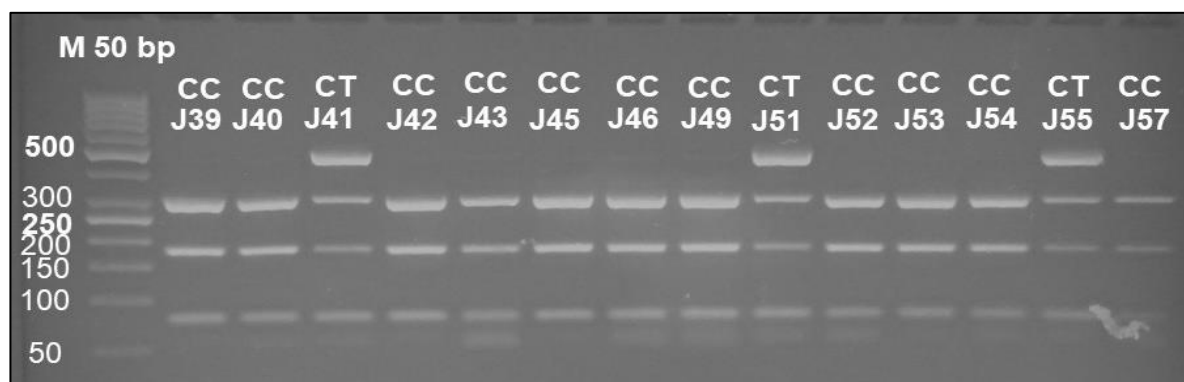


Slika 3.1. Umnazanje *TG* gena duljine 548 parova baza (pb) lančanom reakcijom polimeraze u križanaca simentske i holstein pasine goveda. M – standard razmaka 100 pb, J3-J20 – PCR amplificirani produkt *TG* gena

3.2.3. Restrikcija i očitavanje genotipova

Restrikcija fragmenata *TG* gena veličine 548 pb provedena je *PvuI* restriksijskom endonukleazom. Reakcijska smjesa imala je ukupni volumen 10 μ L, a sastojala se od: 7,85 μ L vode, 2,0 μ L pufer B(10x) i 0,15 μ L *PvuI* restriksijskog enzima. U svaki tubicu s *PCR* produktom (10 μ L) dodano je 10 μ L smjese za restrikciju koja se potom izmiješa na vorteksu i stavlja na inkubaciju. Inkubacija je provedena u vodenoj kupelji na 37°C u trajanju od 4 sata.

Uspješnost restrikcije provjerena je na 3% agaroznom gelu (2,3 g agaroze, 72,8 mL 1xTBE pufera, 1 μ L etidijevog bromida). U jažice je stavljeno 10 μ L produkata restriksijske razgradnje. Elektroforeza je provedena na 80V kroz 3 sata. Nakon završene elektroforeze uzorci su vizualizirani pod UV svjetlom. Uspješnom restrikcijom *TG* gena veličine 548 pb s *PvuI* restriksijskom endonukleazom moguće je dobiti tri genotipa: *CC* (75, 178, 295), *CT* (75, 178, 295, 473) i *TT* (75, 473) kao što je prikazano Slikom 3.2..



Slika 3.2. Restriksijska razgradnja *PCR* produkta *TG* gena križanaca simentske i holstein pasmine goveda s *PvuI* restriksijskom endonukleazom i primjer dobivenih genotipova *CC* (75, 178, 295) i *CT* (75, 178, 295, 473). M – standard razmaka 50 baznih parova; J39-J57– oznake uzoraka.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA

4.1. Polimorfizam *TG* gena

U istraživanom uzorku križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda utvrđen je polimorfizam *TG* gena. Umnažanjem sekvence od interesa duljine 548 pb i daljnjim cijepanjem restrikcijskim enzimom *PsuI* utvrđena su dva genotipa *CC* i *CT*, dok genotip *TT* nije utvrđen. Frekvencije alela i genotipova *TG* gena prikazane su Tablici 4.1..

Tablica 4.1. Frekvencije alela i genotipova *TG* gena

| Lokus | Spol | <i>f</i> alela | | <i>f</i> genotipova | | | H_E | HWE <i>P</i> -značajnost |
|-----------|------------------------|----------------|----------|-------------------------|-------------------------|-----------|-------|-----------------------------|
| | | <i>C</i> | <i>T</i> | <i>CC</i> | <i>CT</i> | <i>TT</i> | | |
| <i>TG</i> | Muški <i>N</i> =10 | 0,75 | 0,25 | 0,50 (<i>N</i> =5) | 0,50 (<i>N</i> =5) | 0 | 0,375 | 0,11 |
| | Ženski <i>N</i> =15 | 0,76 | 0,24 | 0,53 (<i>N</i> =8) | 0,47 (<i>N</i> =7) | 0 | 0,365 | 0,29 |
| | Svi <i>N</i> =25 | 0,76 | 0,24 | 0,52 (<i>N</i> =13) | 0,48 (<i>N</i> =12) | 0 | 0,365 | 0,23 |

N - broj jedinki; *f* - frekvencija; H_E - očekivana heterozigotnost; HWE - Hardy-Weinbergova ravnoteža

U ispitanom uzorku od 25 jedinki (10 bikova i 15 krava) zabilježena je veća frekvencija alela *C* u odnosu na alel *T* (0,76:0,24). Frekvencije alela između muških i ženskih križanaca simentalskog i holštajn goveda gotovo su identične, ($f(C_{\text{muški križanci}}) = 0,75 : (f(C_{\text{ženski križanci}}) = 0,76)$). Genotipovi *CC* i *CT* *TG* gena utvrđeni su kod istog broja muških jedinki (njih 5) s frekvencijom od 0,50. Omjer genotipova kod ženskih križanaca bio je gotovo identičan, 8 jedinki imalo genotip *CC*, a 7 jedinki genotip *CT* te frekvencije genotipova iznose 0,53 : 0,47. Gledajući ispitanu uzorak bez podjele prema spolu, prevladava veći udio jedinki homozigotnog *CC* genotipa (0,52) u odnosu na heterozigotni *CT* genotip (0,48).

Dobiveni rezultati polimorfizma *TG* gena u ovom istraživanju usporedivi su s niže navedenim istraživanjima jer je korištena ista metodologija (ista sekvenca i začetnice, *PsuI* restrikcijska endonukleaza i metoda *PCR-RLFP*). U istraživanju polimorfizma *TG* gena kod pasmina njemački holštajn i šarole, Thaller i sur. (2003.) navode gotovo identične frekvencije alela *C* (0,75; 0,76) te alela *T* (0,25; 0,24) kao u predmetnom istraživanju. Manju frekvenciju alela *C* (0,64) te sukladno veću frekvenciju alela *T* (0,36) u populaciji korejskih goveda utvrdili su Shin i Chung (2007.). Veću zastupljenost alelne varijante *C* navode i druga istraživanja Fortes i sur. (2009.), Pannier i sur. (2010.) i Ardicli i sur. (2019.). U istraživanju Fortes i sur. (2009.) alelna varijanta *C* bila je izrazito visoka u križanaca goveda *Bos taurus* i *Bos indicus* (0,780 do 0,981) da bi u populaciji nelor (Nelore, čisti *Bos indicus*) *C* alel bio fiksiran ($f(C) = 100\%$). No, visoke frekvencije *C* alelne varijante utvrđene su i kod *Bos taurus* goveda različitih uporabnih pravaca. Mesne pasmine goveda (Limousine, Charolais, Hereford, Belgian Blue, Blonde d'Aquitain i Salers) imale su visok udio *C* alelne varijante u rasponu od 0,74 do 0,98, mliječna pasmina frizijsko govedo 0,87, dok je simentalac kao pasmina dvojnih proizvodnih odlika imala

udio alelne varijante C 0,67 (Pannier i sur. 2010.). Iako se svojstvo mramoriranosti mesa dovodi u značajnu vezu sa C alelnom varijantom polimorfности TG gena, a T varijanta s udjelom intramuskularne masti (vidi poglavlje 2.5.1.), znanstveno utemeljenih jednosmjernih odgovora nema. Izrazita zastupljenost alela C može biti rezultat *linkage disequilibrium*a između TG gena i nekog drugog QTL gen-markera koji je pod selekcijskim pritiskom, a koji ima utjecaj na odlaganje masti u organizmu.

U istraživanom uzorku utvrđene su samo frekvencije muških i ženskih homozigotnih jedinki genotipa CC (0,50 i 0,53) i frekvencije heterozigotnih jedinki CT (0,50 i 0,47), dok homozigotnih jedinki TT genotipa nije bilo. Slično predmetnom istraživanju, Fortes i sur. (2009.) također nisu utvrdili TT genotip kod nekih križanaca *Bos indicus* i *Bos taurus* goveda (npr. Rubia Gallega X Nelore). Isti autor navodi da se učešće alelne varijante T povećava uplivom genoma *Bos taurus* goveda. No, Shin i Chung (2007.) na populaciji korejskih goveda, te Ardicli i sur. (2019.) na populaciji holštajnsko-frizijskih bikova (*Bos taurus* skupina) utvrdili su prisutnost sva tri genotipa s distribucijom $CC > CT > TT$. Najveća utvrđena frekvencija genotipa CC bila je 80% (Cassas sur. 2005.), a najmanja 41,1% (Shin i Chung 2007.).

Jedan od populacijskih parametara koji se koristi u procjeni genetske strukture populacije je očekivana heterozigotnost (H_E). Niska vrijednost parametara H_E može indicirati negativne promjene unutar populacije kao što je *inbreeding*. Prosječna očekivana heterozigotnost križanaca simentalske i holštajn pasmine goveda u ovom istraživanju iznosila je 0,365. Razlike za H_E po spolu bile su zanemarive (Tablica 4.1.). Mokhnachova i sur. (2016.) navode veću vrijednost očekivane heterozigotnosti za populaciju ukrajinskog sivog goveda ($H_E = 0,411$) dok znatno niže vrijednosti navode Ardicli i sur. (2019.) za populaciju bikova holštajnsko-frizijske pasmine ($H_E = 0,211$).

Testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže pokazalo je da u istraživanom uzorku križanaca simentalca i holštajn pasmine goveda nije utvrđeno odstupanje očekivanih od utvrđenih frekvencija genotipova. Distribucija genotipova kod devet pasmina goveda bila je u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom u istraživanju Pannier i sur. (2010.). Suprotno, odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže na lokusu TG utvrđeno je kod ukrajinskog sivog goveda (Mokhnachova i sur. 2016.) i bikova holštajnsko-frizijske pasmine (Ardicli i sur. 2019.).

4.2. Utjecaj TG gena na odlike kvalitete trupova križanaca simentalske i holštajn pasmine goveda

U Tablici 4.2. dana je opisna statistika istraživanih utjecaja TG gena na odlike trupova križanaca simentalske i holštajn pasmine goveda. Prosječna porodna masa križanaca iznosila je 40,36 kg s varijacijama od 20 do 56 kg. Križanci kod klanja bili su stari 480 dana i ostvarili prosječnu tjelesnu masu od 535,36 kg s prosječnim dnevnim prirastom 1,030 g. Masa hladnih polovica bila je nešto niža 302,24 kg u odnosu na masu toplih polovica 315,80 kg. Stupanj prekrivenosti masnim tkivom polovica križanaca bila je dobra s prosječnom ocjenom 2,96 dok

je mramoriranost bila slaba. Koristeći *EUROP* sustav klasifikacije trupovi su klasificirani kao dobri 3,32 (oznaka „R“).

Tablica 4.2. Opisna statistika istraživanih utjecaja TG gena na odlike trupova križanaca simentalske i holštajn pasmine goveda

| Pokazatelji | <i>n</i> | \bar{x} | <i>Min</i> | <i>Maks</i> | <i>Sd</i> | <i>CV%</i> |
|-------------------------------------|----------|-----------|------------|-------------|-----------|------------|
| Porodna masa (kg) | 25 | 40,36 | 20,00 | 56,00 | 8,64 | 21,40 |
| Starost kod klanja (dana) | 25 | 480,12 | 440,00 | 532,00 | 19,36 | 4,03 |
| TM kod klanja (kg) | 25 | 535,36 | 433,00 | 717,00 | 73,30 | 13,69 |
| Prirast (g/dan) | 25 | 1,030 | 0,88 | 1,41 | 0,13 | 12,50 |
| Klasa | 25 | 3,32 | 3,00 | 4,00 | 0,47 | 14,34 |
| Stupanj zamašćenosti ¹ | 25 | 2,96 | 2,00 | 4,00 | 0,54 | 18,19 |
| Topla polovica (kg) | 25 | 315,80 | 250,00 | 405,00 | 46,15 | 14,61 |
| Hladna polovica (kg) | 21 | 302,24 | 249,60 | 398,60 | 44,33 | 14,67 |
| Stupanj mramoriranosti ² | 25 | 3,60 | 1,00 | 7,00 | 1,41 | 39,28 |

n – broj jedinki; \bar{x} – aritmetička srednja vrijednost; *Min* – minimalno; *Maks* – maksimalno; *SD* – standardna devijacija; *CV* – koeficijent varijabilnosti; *TM* – tjelesna masa; ¹Stupanj zamašćenosti: od 1 (vrlo slaba) do 5 (vrlo jaka); ²stupanj mramoriranosti: od 1 (bez mramoriranosti) do 10 (izrazito jaka mramoriranost)

Prikaz utjecaja polimorfizma *TG* gena na proučavane pokazatelje kvalitete trupova križanaca simentalske i holštajn pasmine goveda prikazana je Tablicom 4.3..

Tablica 4.3. Utjecaj genotipa i stupanj značajnosti na istraživane pokazatelje trupova križanaca simentalske i holštajn pasmine goveda (*LSMEAN*±*SE*). Prosjeci najvećih vrijednosti između genotipova *CC* i *CT* masno su otisnuti.

| Pokazatelji | Genotip | | Razina značajnosti |
|-------------------------------------|---------------|---------------|--------------------|
| | <i>CC</i> | <i>CT</i> | |
| Porodna masa (kg) | 41,69 | 39,47 | nz |
| TM kod klanja (kg) | 552,44 | 542,75 | nz |
| Prirast (g/dan) | 1,060 | 1,046 | nz |
| Klasa | 3,29 | 3,46 | nz |
| Stupanj zamašćenosti ¹ | 3,06 | 2,83 | nz |
| Topla polovica (kg) | 319,91 | 326,42 | nz |
| Hladna polovica (kg) | 313,81 | 315,04 | nz |
| Stupanj mramoriranosti ² | 3,63 | 3,32 | nz |

TM – tjelesna masa; ¹Stupanj zamašćenosti: od 1 (vrlo slaba) do 5 (vrlo jaka); ²stupanj mramoriranosti: od 1 (bez mramoriranosti) do 10 (izrazito jaka mramoriranost); nz – nije značajno

Jedinke homozigotnog *CC* genotipa imale su nešto veću rodnu masu (+2,22 kg) u odnosu križance *CT* genotipa (41,69 : 39,47 kg) iako su jedinice oba genotipa imale gotovo identične dnevne priraste (*CC* 1,060 : *CT* 1,046) i u prosjeku jednaku starost pri klanju (483

dana). Sukladno, veću završnu tjelesnu masu kod klanja ostvarile su jedinke *CC* genotipa za 9,7 kg (*CC* 552,44 : *CT* 542,75 kg) iako razlike nizu bile statistički značajne. Rezultati istraživanja Shin i Chung (2007.) u suglasju su s rezultatima ovog istraživanja jer su najveću porodnu masu ostvarile jedinke genotipa *CC* (543,26 kg), zatim jedinke genotipa *CT* (534,79 kg) te jedinke *TT* genotipa (533,95 kg). Razlike također nisu bile statistički značajne. Navedeni rezultati usporedivi su s rezultatima Ardicli i sur. (2019.) gdje je distribucija ostvarenih tjelesnih masa holštajnsko-frizijskih bikova u 487 dana tova iznosila *CC>CT>TT*.

U promatranom uzorku utjecaj genotipa nije bio značajan u pogledu razvrstavanja trupova u klase. Prema *EUROP* klasifikaciji trupovi križanaca oba genotipa klasirani su kao trupovi s dobrom punoćom mišića no ravnih profila, dobro razvijenim butom, izbočenim, ali manje širokim leđima i srednje razvijenim lopaticama koje odgovaraju oznaci „R“.

Iako nije utvrđena statistička značajnost, križanci genotipa *CT* imali su veću masu toplih (326,42 kg) i hladnih (315,04 kg) polovica u odnosu na jedinke *CC* kod kojih je masa hladnih polovica bila 319,91 kg, a hladnih polovica 318,81 kg. Vizualnom procijenjenom udjela intramuskularne masti *musculus longissimus dorsi* na presjeku između 6. i 7.-og rebra nije utvrđena značajna razlika između mramoriranosti mesa križanaca *CC* (3,63) naspram križanaca *CT* genotipa (3,32). Navedeni odnosi su posljedica nešto veće zamašćenosti trupova križanaca *CC* u odnosu na križance *CT* genotipa (3,06 : 2,83). Slične rezultate dobili su Pannier i sur. (2010.) istražujući utjecaj polimorfizma *TG* gena na udio intramuskularne masti u *musculus longissimus thoracis et lumborum* (LTL) i *musculus semimembranosus*. Na *TG* lokusu jedinke *CC* genotipa imale su neznatno veći stupanj intramuskularne masti koji nije bio statistički značajan. Naznake ($p < 0,10$) povezanosti alela *C* *TG* gena s izraženijom mramoriranosti i mekoćom (tenderness) mesa Brahman pasmine utvrdili su Cassas i sur. (2005.) kod 479 jedinke. Isti autor navodi statistički značajan utjecaj *C* alelne varijante na debljinu masnog tkiva i mišićne slabine ($p < 0,01$). No, Thaller i sur. (2003.) navode rezultate koji su u suprotnosti s rezultatima ovog istraživanja. U njihovom istraživanju homozigotne jedinke *TT* genotipa njemačkog holštajna imale su od 1,4 puta veći udio intramuskularne masti ($p < 0,05$) u mišiću *musculus longissimus dorsi* od jedinki *CC* ili *CT* genotipa. Iako su u istom istraživanju i jedinke šarole goveda genotipa *CC* imale veće vrijednosti za intramuskularnu mast, ona nije bila statistički značajna. No, postoje i oprečni rezultati povezanosti polimorfizma *TG* gena sa osobinama debljine leđne slanine (Moore i sur. 2003.) ili nekim kvalitativnim osobinama (npr. različitim tjelesnim masama, danima trajanja tova, unosom suhe tvari i drugo; Ardicli i sur. 2019.).

Iz navedenog se može zaključiti da je utjecaj polimorfizma *TG* gena na promatrane kvalitativne i kvantitativne osobine kompleksan. Evidentna je veća zastupljenost alela *C* u odnosu na alel *T* u komparativnim primjerima, a razlike između pasmina proizlaze iz distribucija frekvencija alela (Thaller i sur. 2003.). Mogući rezultat većeg udjela alela *C* je rezultat dugotrajne selekcije. No i kod selekcioniranih pasmina vidljive su razlike unutar iste pasmina. Tako npr. Barendse i sur. (2004.) za angus pasminu navode frekvencije 0,80 i 0,20 za

C i T alele, a Anton i sur. (2012.) frekvencije 0,66 i 0,34. Neravnomjeran omjer frekvencija alela te potom i genotipova rezultat je i načina odabira (što manji stupanj srodstva) i broja uzorkovanih jedinki (što veći broj uzorkovanih jedinki). Nadalje, rezultati o utjecaju genotipa, odnosno preferiranja određene alelne varijante *TG* gena na osobine kvalitete trupova su nedosljedni. Utvrđeno je postojanje drugih SNP na *TG* genu, kao i drugih gen-markera u centromernom području kromosoma 14 koje treba dalje proučavati kako bi se utvrdile povezanosti s metabolizmom lipida kod goveda. Jedan od gena u blizini *TG* gena je i *DGAT1* gen (djeluje na sintezu masti u organizmu) s distancom 25 cM (*engl. centiMorgan, cM*) te se ekspresija jednog gena može reflektirati na indirektni utjecaj drugog gena kao rezultat *linkage disequilibriuma*. Utjecaj epigenetike odnosno vanjskih čimbenika koji djeluju na ekspresiju gena i sukladno, određeno svojstvo od interesa, također treba uzeti u obzir u procjeni kompleksnih svojstava kao što su osobine rasta i tova (Ardicli i sur. 2019.).

4.3. Utjecaj spola na odlike kvalitete trupova križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda

Spol je jedan od čimbenika koji ima značajan utjecaj na dinamiku rasta, konformaciju trupa i kakvoću mesa goveda. U Tablici 4.4. dan je prikaz utjecaja spola na proučavane pokazatelje kvalitete trupova križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda.

Tablica 4.4. Utjecaj spola i stupanj značajnosti na istraživane pokazatelje trupova križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda (*LSMEAN±SE*). Prosjeci najvećih vrijednosti između genotipova jedinki muškog i ženskog spola masno su otisnuti.

| Pokazatelji | Spol | | Razina značajnosti |
|-------------------------------------|---------------|-------------|--------------------|
| | Muški | Ženski | |
| Porodna masa (kg) | 41,90 | 39,26 | nz |
| TM kod klanja (kg) | 609,75 | 485,45 | *** |
| Prirast (g/dan) | 1,174 | 0,932 | *** |
| Klasa | 3,63 | 3,12 | nz |
| Stupanj zamašćenosti ¹ | 2,91 | 2,98 | nz |
| Topla polovica (kg) | 359,36 | 286,98 | *** |
| Hladna polovica (kg) | 350,89 | 277,95 | *** |
| Stupanj mramoriranosti ² | 2,88 | 4,07 | nz |

TM – tjelesna masa; ¹Stupanj zamašćenosti: od 1 (vrlo slaba) do 5 (vrlo jaka); ²stupanj mramoriranosti: od 1 (bez mramoriranosti) do 10 (izrazito jaka mramoriranost); *** p<0,001; nz – nije značajno

Muški križanci simentalke i holštajn pasmine u ispitanom uzorku imali su veću rodnu masu u odnosu na ženske križance za +2,66 kg (41,9 : 39,26 kg) što je djelomično i razlog veće starosne dobi kod klanja muške u odnosu na ženske križance. Muški križanci u prosjeku su bili stariji za 27 dana u odnosu na ženske križance (Tablica 4.4.). Također, većoj klaoničkoj masi muških križanaca (609,74 kg) te sukladno, većoj masi toplih (359,36 kg) i

hladnih polovica (350,89 kg) doprinijeli su veći dnevni prirasti muških križanaca (1,174 g) u odnosu na ženska grla (klaonička masa 485,45 kg, masa toplih (286,98 kg) i hladnih polovica (277,95 kg), dnevni prirast 0,932 g). Razlike između dnevnih navedenih klaoničkih pokazatelja statistički su bile značajne ($p < 0,001$). U istraživanju Karolyi i sur. (2012.) na populaciji simentalških goveda navode veću masu trupova kod bikova u odnosu na junice koju je bila statistički značajna ($p < 0,05$). Također, veće završne mase u tovu od 18 mjeseci imali su križanaci šarolea i simentalške pasmine goveda u istraživanju Bureš i Bartoň (2012.). U njihovom istraživanju utjecaj spola bio je značajan ($p < 0,05$) za osobine: završne mase u tovu (698,0 : 553,7 kg), mase klanja (683,8 : 543,3 kg) te mase toplih polovica (388,2 : 299,6 kg) između bikova i junica navedenih križanaca. Slične rezultate dobili su Marenčić i sur. (2018.) istražujući utjecaj spola i dobi u populaciji simentalških goveda. Autor navodi da su muška grla imala veće tjelesne mase prije klanja (+90,82 kg) i veće prosječne dnevne priraste (+0,136 grama) koji su statistički bili značajni ($p < 0,001$). Dobiveni rezultati istraživanja bili su očekivani jer ženske jedinke zbog manjih ostvarenih dnevnih prirasta ostvaruju u konačnici niže završne mase i sukladno, niže randmane (do 2%).

Trupovi križanaca na liniji klanja klasirani su prosječnom ocjenom 3,63 za muške križance, odnosno 3,12 za ženske križance i razlika nije bila statistički značajna. Takvi trupovi prema EUROP klasifikaciji govedih trupova nose oznaku „R“. U provedenom istraživanju trupovi ženskih jedinki imali su veći stupanj zamašćenosti trupa (2,98) i mramoriranosti mesa (4,07) u odnosu na muške križance (2,91 za stupanj zamašćenosti i 2,88 za mramoriranost mesa) koji su statistički nisu bili značajni. Ženska grla u ranijoj dobi počinju odlagati masti u odnosu na muška grla što rezultira većim sadržajem intramuskularne masti i većim stupnjem prekrivenosti masnim tkivom. Rezultati ovog istraživanja slažu se s rezultatima Karolyi i sur. (2012.) koji navode i značajno veće ($p \leq 0,05$) udjele masnog tkiva u ženskih grla (10,79%) u odnosu na muška grla (7,53%). Nadalje, trupovi ženske junadi križanaca šarole i simentalške pasmine bili su za 1,2 puta zamašćeniji i udio debljine masnog tkiva bio je za 1,5 puta veći u odnosu na iste parametre kod bikova u istraživanju Bureš i Bartoň. (2012.). Značajnu prekrivenost ($p < 0,001$) trupova masnim tkivom ženskih grla u odnosu na muška (3,21 : 3,00) u istraživanju navode Marenčić i sur. (2018.).

4.4. Utjecaj *TG* gena i spola na odlike kvalitete trupova križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda

Utjecaj interakcije *TG* gena i spola na odlike kvalitete trupova križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda prikazan je u Tablici 4.5..

Tablica 4.5. Utjecaj interakcije spola i genotipa *TG* gena na istraživane pokazatelje trupova križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda (*LSMEAN*±*SE*). Prosjeci najvećih vrijednosti između pokazatelja masno su otisnuti.

| Pokazatelji | CC | | CT | |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Muški | Ženski | Muški | Ženski |
| Porodna masa (kg) | 40,60 | 41,88 | 43,20 | 36,29 |
| TM kod klanja (kg) | 637,79 ^a | 457,62 ^{bA} | 591,22 ^B | 490,57 ^{bA} |
| Prirast (g/dan) | 1,234 ^a | 0,905 ^{bA} | 1,136 ^B | 0,948 ^{bA} |
| Klasa | 3,67 | 2,95 | 3,64 | 3,26 |
| Stupanj zamašćenosti ¹ | 2,82 | 3,23 | 2,92 | 2,78 |
| Topla polovica (kg) | 372,15 ^{aA} | 273,58 ^{bA} | 353,15 ^{BA} | 297,12 ^{BB} |
| Hladna polovica (kg) | 361,98 ^A | 272,52 ^B | 346,07 ^A | 282,77 ^B |
| Stupanj mramoriranosti ² | 2,96 | 4,28 | 2,78 | 3,87 |

TM – tjelesna masa; ¹Stupanj zamašćenosti: od 1 (vrlo slaba) do 5 (vrlo jaka); ²stupanj mramoriranosti: od 1 (bez mramoriranosti) do 10 (izrazito jaka mramoriranost); vrijednosti u istom redu označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju **A:B** $p < 0,05$; **A:B** $p < 0,001$; **a:b** $p < 0,0001$

Ženski križanci CC genotipa imali su veću porodnu masu (+1,28 kg) u odnosu na muške križance CC genotipa (41,88 : 40,60 kg), dok su u slučaju CT genotipa imale manju porodnu masu (-6,77 kg) u odnosu na muške križance istog genotipa što nije bilo statistički značajno (Tablica 4.4.). Muški križanci oba genotipa ostvarili su veće dnevne priraste u odnosu na ženske križanke istog genotipa ($CC_{(M:ž)} = 1,234 : 0,905$ kg/dan, ($CT_{(M:ž)} = 1,136 : 0,948$ kg/dan) koji su bili statistički značajni ($p < 0,01$ i $p < 0,001$; Tablica 4.5.). U konačnici distribucija prosječne vrijednosti za tjelesnu masu klanja kod križanaca obzirom na genotip bila je $CC_{(M)} > CT_{(M)} > CC_{(ž)} > CT_{(ž)}$, a razlike su bile statistički značajne (Tablica 4.4.). Razlika u završnim tjelesnim masama bila je veća između muških i ženskih križanaca CC genotipa (+162,17 kg), dok je razlika između muških i ženskih križanaca CT genotipa bila manja (+100,75 kg). Postizanje završne tjelesne mase u direktnoj je vezi sa starošću, odnosno dobi jedinke kod klanja. Tako su muški križanci oba genotipa ($CC = 637,79$ kg; $CT = 591,22$ kg) klani kasnije u usporedbi sa ženskim križancima istih genotipova ($CC = 457,62$ kg; $CT = 490,57$ kg). Iako se rezultati ovog istraživanja ne mogu direktno komparirati s rezultatima Jurić (2017.) koja je utvrđivala povezanost nekih odlika trupova s polimorfizmom *DGAT1* gena, pošto se *DGAT1* gen nalazi se u blizini centromerne regije *BTA14* kao i *TG* gen, a istraživanje je uključivalo također križance simentalke i holštajn pasmine, kompariranje će biti vrlo općenito. Jurić (2017.) navodi da su muški križanci *KK*

genotipa (*K* alel dovodi se u vezu s većim udjelom masnog tkiva) ostvarili su veću masu klanja, veći bruto i neto dnevni prirast.

Razlike polimorfizama *CC* i *CT* na lokusu *TG* za osobine masa toplih i hladnih polovica bile su značajne na svim razinama kao što je prikazano u Tablici 4.5.. Razlika u masi toplih polovica između muških i ženskih križanaca *CC* genotipa bila je 1,4 puta u korist muških jedinki (372,15 : 273,58 kg), dok je ista razlika između muških i ženskih jedinki *CT* genotipa bila manja, 1,2 puta (353,15 : 297,12 kg). Sukladno, veća masa hladnih polovica zabilježena je kod muških križanaca oba genotipa ($CC_{(M)} = 361,98$ kg, $CT_{(M)} = 346,07$ kg) u odnosu na ženske križance ($CC_{(ž)} = 272,52$ kg, $CT_{(ž)} = 282,77$ kg).

Nije utvrđen značajan utjecaj *TG* gena na klasu, stupanj zamašćenosti i mramoriranosti mesa (Tablica 4.4.). Prema *EUROP* klasifikaciji, trupovi muških križanaca oba genotipa imali su bolje razvijeno mišićje (*CC*, *CT* > 3,63) u odnosu na trupove ženskih križanaca (*CC*, *CT* > 2,94). Stoga su muški trupovi klasificirani kao vrlo dobri, a ženski kao dobri. Suprotno, trupovi ženskih križanaca imali su veći stupanj zamašćenosti (*CC* = 3,23, *CT* = 2,78) u usporedbi s trupovima muških križanaca (*CC* = 2,82, *CT* = 2,92). Iako su ženske jedinice genotipa *CC* imale trupove s najvećom prosječnom ocjenom (3,23) i trupovima preostalih genotipova s ocjenom >2,70 je dodijeljena oznaka 3 što označava srednju prekrivenost trupa masnim tkivom pri čemu su mišići i dalje vidljivi između rebara. Sukladno, trupovi ženskih jedinki *CC* genotipa pokazali su najveći udio mramoriranosti (4,28), zatim *CT* genotipa (3,87), dok su trupovi muških jedinki bili najmanje mramorirani (*CC* = 2,96; *CT* = 2,78). Slične rezultate, bolju klasifikaciju trupova muških križanaca te veći udio zamašćenosti i debljine *musculus longissimus dorsi* kod ženskih križanaca navodi Jurić (2017.). Navedeno je očekivano jer ženska grla imaju bolju sposobnost nakupljanja masti u organizmu od muških grla.

Sagledavajući utjecaj polimorfizma *TG* gena i utjecaj spola na istraživane pokazatelje: dnevni prirast, tjelesnu masu pri klanju, masu toplih i hladnih polovica te klasu distribucija genotipova bila je: $CC_{(M)} > CT_{(M)} > CC_{(ž)} > CT_{(ž)}$. Za pokazatelj porodne mase jedinki distribucija je išla u prilog heterozigotnom genotipu muškog te homozigotnom genotipu ženskog spola: $CT_{(M)} > CC_{(ž)} > CC_{(M)} > CT_{(ž)}$. Pokazatelji zamašćenosti i mramoriranosti trupa razlikovali su se između genotipova i spolova kako slijedi: $CC_{(ž)} > CT_{(M)} > CC_{(M)} > CT_{(ž)}$ i $CC_{(ž)} > CT_{(ž)} > CC_{(M)} > CT_{(M)}$.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja povezanosti polimorfizama *TG* gena na odlike kvalitete trupova 25 uzorkovanih jedinki križanaca simentalke i holštajn pasmine može se zaključiti:

1. utvrđen je polimorfizam *TG* gena u križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda
 - i. frekvencija alela *C* (0,76) bila je veća u odnosu na frekvenciju alela *T* (0,24),
 - ii. utvrđene su frekvencije samo dvaju genotipova *CC* (0,52) i *CT* (0,48) dok genotip *TT* nije utvrđen
 - iii. uočene frekvencije genotipova na *TG* lokusu muških i ženskih križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda nisu značajno odstupale od očekivanih frekvencija u populaciji koja je u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.
2. nije utvrđena statistički značajna povezanost *TG* gena na odlike kvalitete trupova križanaca simentalke i holštajn pasmine
 - i. križanci *CC* genotipa imali su veću porodnu masu (+2,22 kg), veći dnevni prirast (+14 g), veću masu klanja (+9,69 kg), stupanj zamašćenosti (0,23) i mramoriranosti (0,31) u odnosu na križance *CT* genotipa,
 - ii. križanci *CT* genotipa imali veću masu toplih (6,51 kg) i hladnih polovica (1,23 kg) te bolju klasificiranost trupova (0,17) u odnosu na križance *CC* genotipa.
3. nije utvrđena statistički značajna povezanost spola na odlike kvalitete trupova križanaca simentalke i holštajn pasmine
 - i. križanci muškog spola imali su veću porodnu masu (+2,64 kg), veći dnevni prirast (+0,24 g), veću masu klanja (+124,29 kg), toplih (+72,38 kg) i hladnih (+72,94 kg) polovica te bolju klasificiranost trupova (0,51),
 - ii. trupovi križanaca ženskog spola imali su veći stupanj zamašćenosti (0,07) i mramoriranosti (1,19).
4. utvrđen je utjecaj interakcije *TG* gena i spola na neke odlike kvalitete trupova križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda
 - i. muški križanci *CT* genotipa imali su veću masu klanja u odnosu na ženske križance oba genotipa ($p < 0,01$)
 - ii. muški križanci *CC* genotipa imali veću masu klanja u odnosu na ženske jedinke *CC* ($p < 0,01$) i *CT* ($p < 0,001$) genotipa
 - iii. muški križanci oba genotipa imali su veće dnevne priraste, masu toplih i hladnih polovica u odnosu na ženske jedinke oba genotipa ($p < 0,01$),
5. nije utvrđen je utjecaj interakcije *TG* gena i spola na klasiranost, stupanj zamašćenosti i mramoriranosti trupova križanaca simentalke i holštajn pasmine goveda

- i. trupovi muških križanaca *CC* i *CT* genotipova imala su bolju klasiranost u odnosu na ženske križance,
- ii. trupovi ženskih jedinki *CC* genotipa bili su jače zamašćeni i prožeti intramuskularnom mašću.

6. POPIS LITERATURE

1. Anton I., Kovacs K., Fesus L., Varhegy J., Lehel L., Hajda Z., Polgar J.P., Szabo F., Zsolnai A. (2008a). Effect of DGAT1 and TG gene polymorphisms on intramuscular fat and on milk production traits in different cattle breeds in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*. 56(2): 181-186
2. Anton I., Kovacs K., Hollo G., Farkas V., Szabo F., Egerszegi I., Ratky J., Zsolnai A., Brussow K.P. (2012). Effect of DGAT1, leptin and TG gene polymorphisms on some milk production traits in different dairy cattle breeds in Hungary. *Archiv Tierzucht*. 55(4): 307-314
3. Ardicli S., Dincel D., Samli H., Balci F. (2017). Effect 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
4. Ardicli S., Samli H., Vatansever B., Soyudal B., Dincel D., Balci F. (2019). Comprehensive assessment of candidate genes associated with fattening performance in Holstein-Friesian bulls. *Archives Animal Breeding*. 62: 9-32
5. Barać Z., Dražić M. M., Solić D., Fatović Ž., Bulić Vesna, Ivkić Z., Špehar M., Mahnet Ž., Mulc D., Poljak F., Lučić Robić E., Duvnjak G. (2013). 100 godina organiziranog uzgojno-seleksijskog rada u stočarstvu Hrvatske. Hrvatska poljoprivredna agencija.
6. Barendse W.J. (1999). Assessing lipid metabolism. Patent. International Publication Number: WO 99/23248. World Intellectual Property Organization, Geneva, Switzerland.
7. Barendse W.J., Bunch R.J., Thomas M., Armitage S., Baud S., Donaldson N. (2004). The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 44(7): 669-674
8. Bureš D., Bartoň L. (2012). Growth performance, carcass traits and meat quality of bulls and heifers slaughtered at different ages. *Czech Journal of Animal Science*. 57: 34-43
9. Burrell D. N., Moser G., Hetzel J., Mizoguchi Y., Hirano T., Sugimoto Y., Mengersen, K. (2004). Meta analysis confirms associations of the TG5 thyroglobulin polymorphism with marbling in beef cattle. U : 29th International Conference on Animal Genetics ISAG, 11–16September 2004, Tokyo, Japan, p. 117
10. Casas E., White S.N., Riley D.G., Smith T.P., Brenneman R.A, Olson T.A., Johnson D.D., Coleman S.W., Bennett G.L., Chase C.C. Jr. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*. 83: 13–19
11. Casas E., White S.N., Shackelford S.D., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Bennett G.L., Smith T. (2007). Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass traits in beef cattle. *Journal of Animal Science*. 85(11): DOI: 10.2527/jas.2007-0179

12. Cattle QTL Database. <https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/chromap?chromos=6&showAsso=y&showEQTL=y&showQTL=y&showgmap=y&showlmap=y> – pristup 22.08.2020.
13. Dutra de Carvalho T., Siqueira F., de Almeida Torres Júnior R.A., de Medeiros S.R., Dias Feijó G.L., Dorta de Souza Junior M.D., Zaidan Blecha I.M., Soares C.O. (2012). Association of polymorphisms in the leptin and thyroglobulin genes with meat quality and carcass traits in beef cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 41(10): 2162-2168
14. FAOSTAT (2020). Food and Agricultural Organization of United Nation. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA> – pristup: 19. 08 2020.
15. Fortes M.R.S., Curi R.A., Chardulo L.A.L., Silveira A.C., Assumpcao M.E.O.D., Visintin J.A., de Oliveira H.N. (2009). Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. *Genetics and Molecular Biology*. 32(1): 75-82
16. Gan Q.F., Zhang L.P., Li J.Y., Hou G.Y., Li H.D., Gao X., Ren H.Y., Chen J.B., Xu S.Z. (2008). Association analysis of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. *Journal of Applied Genetics*. 49(3): 251-255
17. Grgić I., Zrakić M. (2015). Samodostatnost Republike Hrvatske u Proizvodnji goveđeg mesa. *Meso*. 51(1): 51-55
18. Haluška J., Rimac D. (2005). Pregled stanja holštajn krava u Hrvatskoj. *Stočarstvo*. 59(4): 301-317
19. HPA (2008-2018). Hrvatska poljoprivredna agencija, Godišnja izvješća HPA. <https://hpa.mps.hr/publikacije-godisnja-izvjesca/> – pristup 20.08.2020.
20. <http://lounckemarcel.weebly.com/beef--vita.html#sthash.2xjWd9AU.dpbs> – pristup: 29.07.2020.
21. Illumina. Agriculture Consortia. Collaborating to study plant and animal genomics. <https://www.illumina.com/areas-of-interest/agrigenomics/consortia.html> - pristup 28.8.2020.
22. Ivanković A. (2017). Uzgoj goveda i sustavi proizvodnje goveđeg mesa. Interna skripta
23. Ivanković A., Kos I. (2017). Kvaliteta goveđeg trupa. Interna skripta
24. Jakopović I. (2007). Uzgoj simentalca u Hrvatskoj. *Stočarstvo*. 61(5): 379-394
25. Jurić A. (2017). Povezanost DGAT1 gena s odlikama kvalitete trupova križanaca simentalske i Holstein pasmine goveda. Diplomski rad. Agronomski fakultet. Zagreb
26. Karolyi D., Čubrić-Ćurik V., Salajpal K., Đikić M. (2012). The effect of sex and DGAT1 gene polymorphism on fat deposition traits in simmental beef cattle. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 62(1): 91-100

27. Marenčić D., Ivanković A., Kozačinski L., Popović M., Cvrtila Ž. (2018). The effect of sex and age at slaughter on the physicochemical properties of baby beef meat. *Veterinarski arhiv*. 88(1): 101-110
28. Meat N' Bone. <https://meatnbone.com/blogs/the-clever-cleaver/meat-beef-grading-system-understanding> – pristup 27.08.2020.
29. Mokhnachova N., Suprovich T., Dobrynska M., Fursa N. (2016). Characteristics of Ukrainian Grey Cattle by DNA-markers. *Animal Breeding and Genetics*. 51: 283-289
30. Moore S.S., Li C., Basarab J., Snelling W.M., Kneeland J., Murdoch B., Hansen C., Benkel B. (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*. 81:1919–1925
31. Narodne novine (NN 116/05). Pravilnik o zaštiti životinja pri klanju ili usmrćivanju.
32. Narodne novine (NN 20/05). Pravilnik o kakvoći goveđih trupova i polovica na liniji klanja.
33. Narodne novine (NN 71/18). Pravilnik o razvrstavanju i označivanju goveđih, svinjskih i ovčjih trupova te označivanju mesa koje potječe od goveda starih manje od 12 mjeseci.
34. National Center for Biotechnology Information (NCBI). National Library Medicine. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_037341.1?report=genbank&from=8182105&to=8488828&strand=true – pristup 22.08.2020.
35. National Center for Biotechnology Information (NCBI). National Library Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/280706> – pristup 27.08.2020.
36. 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
37. R Development Core Team. (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-project.org>
38. SAS Institute Inc. (2009). SAS/STAT® 9.2 User's Guide, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.
39. Shin S.C., Chung E.R. (2007). Association of SNP marker in the Thyroglobulin Gene with Carcass and Meat Quality Traits in Korean Cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 20(2): 172-177
40. Thaller G., Kühn C., Winter A., Ewald G., Bellmann O., Wegner J., Zühlke H., Fries R. (2003). DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*. 35(5): 354-357

41. Uredba komisije (EZ) br. 1249/2008 od 10. prosinca 2008. o utvrđivanju detaljnih pravila primjene ljestvice Zajednice za klasifikaciju goveđih, svinjskih i ovčjih trupova i izvješćivanja o njihovim cijenama. Službeni list Europske unije. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1249&from=SK> – pristup: 29.07.2020.
42. Zhang L.P., Gan Q.F., Hou G.Y., Gao H.J., Li J.Y., Xu S.Z. (2015). Investigation of *TG* gene variants and their effects on growth, carcass composition and meat quality traits in Chinese Steers. *Genetic and Molecular Research*. 14(2): 5320-5326

ŽIVOTOPIS

Marija Jažo rođena je 5. srpnja 1995. godine u Novoj Gradišci. Živi u mjestu Rešetari, pokraj Nove Gradiške koja se nalazi u Brodsko-posavskoj županiji. Osnovnu školu je pohađala u Rešetarima (Osnovna škola Ante Starčević), a srednju školu upisuje u Novoj Gradišci (Opća gimnazija Nova Gradiška). Tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja bavila se atletikom i rukometom te je pjevala u zboru.

Godine 2014. upisuje preddiplomski studij na Sveučilištu u Zagrebu na Agronomskom fakultetu odabirući smjer Animalne znanosti. Preddiplomski studij završava 2017. godine obranom rada „Bioaktivne tvari u mlijeku i mliječnim proizvodima“. Iste godine upisuje diplomski studij na Agronomskom fakultetu, smjer Proizvodnja i prerada mesa.

Tijekom studija obavljala je stručnu praksu na OPG-u u Gornjim Bogićevcima te u laboratoriju na Zavodu za specijalno stočarstvo na Agronomskom fakultetu pri čemu je stekla znanje rada u laboratoriju (PCR, priprema i provođenje restrikcije, očitavanje genotipova). Tijekom srednjoškolskog obrazovanja i studiranja obavlja sezonske i razne studentske poslove.