Polimorfizam DGAT1 gena u subpopulaciji istočnofrizijske ovce, safolka i travničke pramenke u Republici Hrvatskoj

Šalković, Marina

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:874181

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Polimorfizam DGAT1 gena u subpopulacijama istočnofrizijske ovce, safolka i travničke pramenke u Republici Hrvatskoj

DIPLOMSKI RAD

Marina Šalković

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mesa

Polimorfizam DGAT1 gena u subpopulacijama istočnofrizijske ovce, safolka i travničke pramenke u Republici Hrvatskoj

DIPLOMSKI RAD

Marina Šalković

Mentor:

Doc.dr.sc. Ante Kasap

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Marina Šalković**, JMBAG 0178100458, rođena 10.04.1994. u Sisku, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Polimorfizam DGAT1 gena u subpopulacijama istočnofrizijske ovce, safolka i travničke pramenke u Republici Hrvatskoj

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 studentice **Marine Šalković**, JMBAG 0178100458, naslova

Polimorfizam DGAT1 gena u subpopulacijama istočnofrizijske ovce, safolka i travničke pramenke u Republici Hrvatskoj

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	Doc.dr.sc. Ante Kasap	mentor	_____
2.	Izv.prof.dr.sc. Jelena Ramljak	član	_____
3.	Prof.dr.sc. Krešimir Salajpal	član	_____

Zahvala

Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc. Anti Kasapu na savjetima i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem izv.prof.dr.sc. Jeleni Ramljak i dr.sc. Valentinu Držaiću na stručnoj pomoći i mentorstvu prilikom izvođenja praktičnog dijela ovog rada.

Zahvalu upućujem i mag.ing.agr. Mateji Pećini na ukazanoj podršci i savjetima prilikom izrade rada.

Veliko hvala mojoj kolegici i prijateljici, mag.ing.agr. Moniki Šikić s kojom sam provodila neprospavane noći učeći i pripremajući se za kolokvije, seminare i ispite i koja mi je bila oslonac u ove dvije godine diplomskog studija. Naravno ne mogu zaboraviti i ostatak naše male družine; Tena, Danijel, Karlo, Andrija Š. i Andrija Ž. veliko vam hvala na svemu!

Posebno se želim zahvaliti prijateljici Sandi Smirčić na neizmjernoj podršci i ohrabrenju prilikom studija, makar bile udaljene 300 km jedna od druge.

Najveću zahvalu upućujem svojoj majci Deani, sestri Tihani, bratu Mariu te djedu, baki i ujaku koji su uvijek vjerovali u mene te prabaki koja nažalost više nije s nama.

Svima još jednom velika hvala!

Marina

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Pregled literature 3

2.1. Ovčarstvo u svijetu 3

2.2. Ovčarstvo u Republici Hrvatskoj 5

2.3. Pasmine ovaca 8

2.3.1. Istočnofrizijska ovca 8

2.3.2. Safolk (Suffolk) 9

2.3.3. Travnička pramenka 10

2.4. Karakteristike janjećeg mesa 12

2.5. Karakteristike ovčjeg mlijeka 13

2.6. Diacilglicerol O-aciltransferaza (DGAT1) 14

2.6.1. Utjecaj DGAT1 gena na meso 14

2.6.2. Utjecaj DGAT1 gena na mlijeko 15

3. Materijali i metode 16

3.1. Životinje korištene u istraživanju 16

3.2. Izolacija genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNK) 16

3.3. Postupak izolacije DNK iz dlake 16

3.4. Postupak izolacije DNK iz krvi 17

3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR) 18

3.6. Determinacija polimorfizama DGAT1 gena 19

3.7. Statistička analiza 20

4. Rezultati istraživanja i rasprava 21

5. Zaključak 26

6. Literatura 27

Životopis 31

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Marine Šalković**, naslova

Polimorfizam DGAT1 gena u subpopulaciji istočnofrizijske ovce, safolka i travničke pramenke u Republici Hrvatskoj

Enzim diacilglicerol O-aciltransferaza (DGAT1) ima važnu ulogu u sintezi triglicerida, a gen koji ga kodira predstavlja kandidatni gen za mnoga svojstva kakvoće i količine ovčjeg mesa i mlijeka. Cilj istraživanja bio je utvrditi polimorfizam DGAT1 gena u subpopulacijama istočnofrizijske ovce, safolka i travničke pramenke u Hrvatskoj. Također, cilj je bio razmotriti potencijal selekcije ovaca kod istraživanih pasmina temeljem dobivenih rezultata i publiciranih učinaka gena DGAT1 na neka važna svojstva u proizvodnji mesa i mlijeka. Istraživani lokus je bio polimorfan kod safolka i travničke pramenke, a monomorfan kod istočnofrizijske ovce. Izrazita prevalencija alela C i genotipa CC utvrđena je kod sve tri pasmine. Očekivana heterozigotnost kod safolka (H_e=0,073) i travničke pramenke (H_e=0,127) je bila izrazito niska dok je kod istočnofrizijske ovce bila ravna nuli (H_e=0,0). Temeljem razlika između opaženih i očekivanih frekvencija genotipova, utvrđeno je da su istraživane populacije u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (P>0,05). Uzimajući u obzir utvrđene frekvencije genotipova i poznate (publicirane) utjecaje polimorfizma DGAT1 gena na veći broj svojstava, može se zaključiti da je profil DGAT1 u istraživanim populacijama u povoljan za količinu proizvedenog mesa i kvalitetu mlijeka, a nepovoljan za količinu mlijeka i kvalitetu mesa

Ključne riječi: gen DGAT1, ovce, mast, meso, mlijeko

Summary

Of the master's thesis – student **Marina Šalković,** entitled

Polymorphism of DGAT1 gene in subpopulation of East Friesian sheep, Suffolk and Travnik pramenka sheep in the Republic of Croatia

Enzyme diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT1) plays an important role in the final stage of triglyceride synthesis. The gene that encodes this enzyme represents an important candidate gene for numerous quantitative and qualitative meat and dairy traits. The study aimed to determine the polymorphism of this gene in subpopulations of the East Friesian, Suffolk and Travnik pramenka breed in Croatia. The study also aimed to roughly examine the potential of selection in these populations, based upon the obtained results and known (published) effects of the gene on some important meat and dairy traits. The examined locus was polymorphic in Suffolk and Travnik pramenka, while it was monomorphic in the East Friesian breed. Allele C and genotype CC were prevalent in all of the examined breeds. Extremely low expected heterozygosity was found in Suffolk (H_e=0.073), and Travnik pramenka (H_e=0.127), while it equated zero in the East Friesian breed (H_e=0). Based upon the differences between the determined and expected frequencies of the genotypes, it was determined that all the populations under consideration were in Hardy-Weinberg equilibrium (P>0.05). By taking into account the determined frequencies of genotypes and the known (published) effects of DGAT1 polymorphism on numerous traits, it can be concluded that the DGAT1 profile in the studied populations is favorable for meat yield and milk quality traits and unfavorable for milk quantity and meat quality traits.

Keywords: DGAT1 gene, sheep, fat, meat, milk

1. Uvod

Uzgoj ovaca u Hrvatskoj je primarno orijentiran na proizvodnju mesa. Sukladno tome, janjetina predstavlja najvažniji proizvod hrvatskog ovčarstva. Uz stanovite razlike uvjetovane uzgojnim područjem, pasminom i posebnim zahtjevima potrošača, većina janjadi uzgojene u hrvatskoj se kolje pri tjelesnoj masi 20-25 kg (trupovi mase cca. 10-13 kg). Manji broj gospodarstava u Hrvatskoj je orijentiran na proizvodnju mlijeka, koje se najčešće prerađuje u tradicijske sireve (istarski, paški) na samim gospodarstvima ili se predaje mljekarama (siranama). Proizvodnja vune je od marginalnog značaja i u pravilu nema gospodarstava u kojima vuna predstavlja značajan izvor dohotka (Mioč i sur. 2007.).

Uzgojno selekcijski rad u ovčarstvu diljem svijeta, pa tako i u Hrvatskoj, uglavnom je usmjeren na poboljšanje svojstava od ekonomskog značaja. "Program uzgoja ovaca u Republici Hrvatskoj" (Mioč i sur. 2011.) je temeljni dokument u organizaciji i provedbi uzgojno selekcijskog rada u ovčarstvu u Republici Hrvatskoj kojim su propisani: način prikupljanja podataka, način procjene uzgojnih vrijednosti te diseminacije dobivenih rezultata i njihova implementacija u praksi. Postupci kontrole proizvodnih osobina su u skladu s procedurama propisanim od strane međunarodne organizacije za provođenje kontrola u stočarstvu (*engl. International Committee for Animal Recording*), a genetsko vrednovanje jedinki obuhvaćenih uzgojno selekcijskim radom temelji se na rezultatima najboljeg linearnog nepristranog predviđanja (*engl. Best linear unbiased prediction*). Značajnim razvojem suvremenih molekularnih genetskih metoda u novije vrijeme omogućeno je simultano korištenje većeg broja genetskih markera pri procjeni uzgojnih vrijednosti životinja (Meuwissen i sur. 2001.). Međutim, ovaj koncept poznat pod nazivom „genomska selekcija", pored svih potencijalnih benefita nad klasičnim genetskim vrednovanjem, još uvijek nailazi na velik broj prepreka za masovnu implementaciju u brojne ovčarske uzgojne programe.

Veća produktivnost životinja je od začetka suvremenog uzgojno selekcijskog rada glavni cilj u gotovo svim svjetskim uzgojnim programima. Međutim, u novije vrijeme sve se više pažnje posvećuje kvaliteti dobivenih proizvoda (mesa i mlijeka), kao i brojnim drugim svojstvima koja definiraju dugovječnost životinja u proizvodnji. Diljem svijeta provode se brojna istraživanja koja imaju za cilj utvrditi povezanost genotipa i fizikalno-kemijskih karakteristika ovčjih proizvoda. Visok stupanj mramoriranosti mesa i visok udio mliječne masti samo su neke od poželjnih karakteristika mesa i mlijeka, pa su napori mnogih znanstvenika usmjereni ka trajnom poboljšanju istih. Diacilglicerol O-aciltransferaza 1 (DGAT1) je važan enzim u sintezi masti koji kontrolira brzinu sinteze triglicerida u adipocitima (Coleman i Bell 1976.), a kodiran je istoimenim genom DGAT1 koji je kod ovaca smješten na devetom kromosomu. Najveći stupanj ekspresije gena DGAT1 je u adipoznom tkivu i tankom crijevu (Chen i Farese 2005.), a obzirom na esencijalnu ulogu koju ovaj enzim ima u metabolizmu masti, DGAT1 gen se smatra važnim

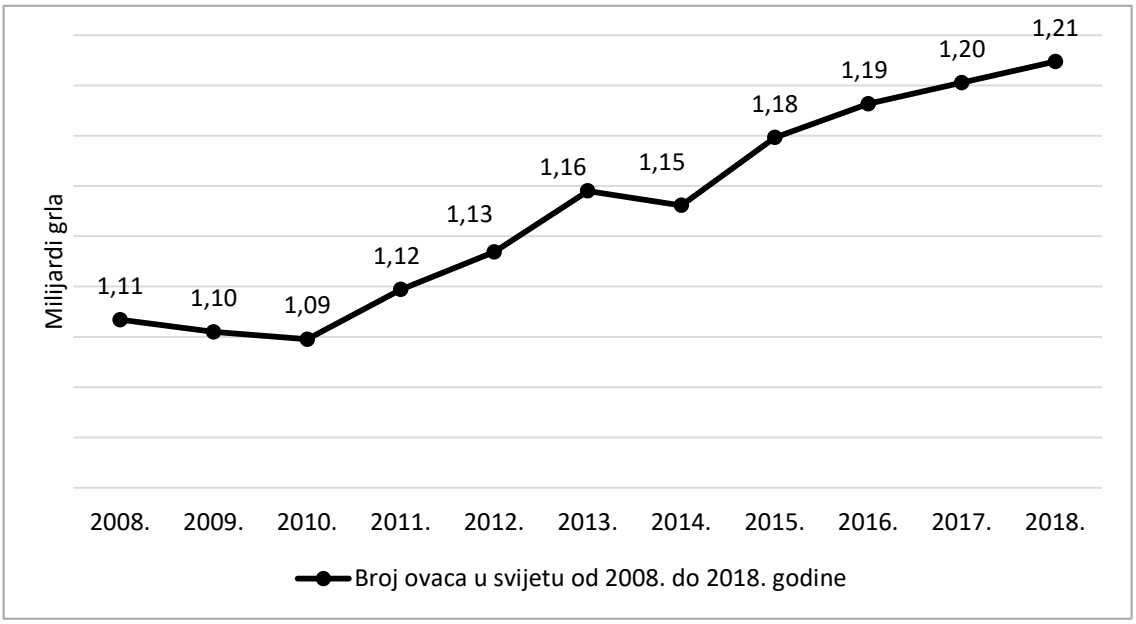
kandidatnim genom za intramuskularnu mast (Xu i sur. 2008.) i mliječnu mast (Scata i sur. 2009.) kod ovaca. Do sada su provedena brojna istraživanja s ciljem utvrđivanja učinka DGAT1 na spomenuta svojstva kod brojnih vrsta i pasmina preživača, a utvrđeni rezultati sugeriraju postojanje veze genotip-fenotip. Ipak, razlike u utvrđenom stupnju i smjeru djelovanja supstitucijskih učinaka alela istraživanog gena za pojedina svojstva nisu u potpunosti konzistentne između pojedinih istraživanja, što otežava potpunu generalizaciju učinka ovog gena na spomenuta svojstva.

Istraživanje pretpostavlja polimorfizam DGAT1 gen u subpopulacijama stočnofrizijske ovce, safolka i travničke pramenke u Hrvatskoj, a pretpostavka se temelji na činjenici da je gen bio polimorfan u svim do sada publiciranim istraživanjima kod ovaca. Geni koji imaju značajan učinak na važna svojstva životinja i/ili njihovih proizvoda predstavljaju važan alat za selekciju, a genetska varijabilnost (polimorfizam) istih je osnovni preduvjet selekcije. Stoga, cilj istraživanja je utvrditi polimorfnost gena DGAT1 u spomenutim pasminama ovaca, te temeljem dobivenih rezultata okvirno procijeniti mogućnost selekcije na neka svojstva važna u proizvodnji mesa i mlijeka, referirajući se na dosad utvrđene i publicirane učinke ovog gena kod ovaca.

2. Pregled literature

2.1. Ovčarstvo u svijetu

Ovčarstvo je važna poljoprivredna grana u mnogim državama svijeta, a posebice u područjima klimatskih, geoloških i pedoloških uvjeta koji limitiraju mogućnosti uzgoja drugih vrsta životinja (Mioč i sur. 2007.). Ovce se primarno uzgajaju radi proizvodnje mesa i mlijeka, a vuna, koža, gnoj itd. predstavljaju neke od sporednih, ali također vrlo vrijednih proizvoda ovčarstva. Ovčje meso se može konzumirati bez ikakvih religijskih prepreka, što doprinosi njegovoj konzumaciji u svim krajevima svijeta. Prema FAO (2018.) broj ovaca u svijetu je bio otprilike 1,21 milijardu. U Grafikonu 2.1. može se uočiti generalni trend povećanja broja ovaca u svijetu od 2008. do 2018., uz blagi pad između 2008. i 2010., te 2013. i 2014. godine.



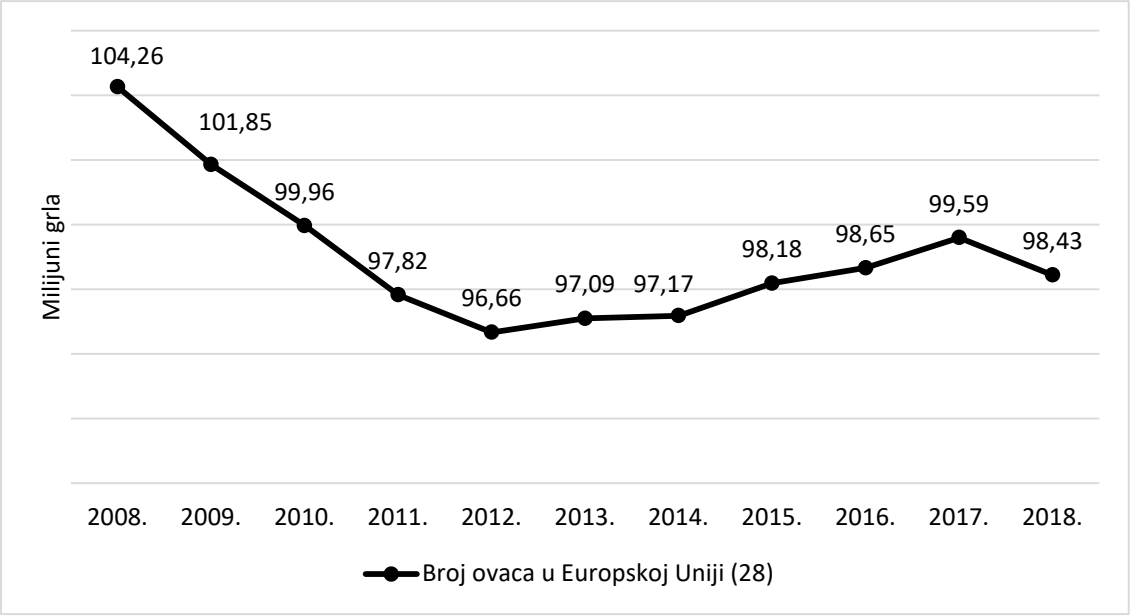
Grafikon 2.1. Broj ovaca u svijetu
Izvor: FAO 2018. – pristup 03.09.2020.

U uzgoju ovaca po kontinentima dominira Azija (42,6%), potom Afrika (31,7%), Europa (10,8%), Oceanija (8,1%) te Amerika (Sjeverna, Srednja i Južna) sa 6,8% (FAO 2018).

Vodeće države u uzgoju ovaca 2018. godine bile su Kina (164,078,900 ovaca) potom Australija (70,067,316), Indija (61,666,343), Nigerija (42,971,860), Sudan (40,846,000), Iran (39,670,704), Ujedinjeno Kraljevstvo (33,781,000), Turska (33,677,636; FAO 2018.).

Prema HAPIH-u (2020.) na području Europske unije nalazi se 94 milijuna ovaca i koza (87,5% ovaca i 12,5% koza), a ukupna proizvodnja mesa ovaca i koza iznosi oko milijun tona godišnje. Iz Grafikona 2.2. je vidljivo znatno opadanje brojnosti ovaca Europskoj uniji u razdoblju između 2008. i 2012. godine. Uz oporavak populacije u razdoblju između 2012. i 2017. godine,

nakon 2017. slijedi ponovni pad brojnosti ovaca, što sve skupa sugerira negativan trend brojnosti ovaca u zemljama Europske unije u posljednjem desetljeću. Kako bi se spriječilo daljnje opadanje brojnosti ovaca, Europski parlament usvojio je Rezoluciju o stanju i budućnosti sektora ovčarstva i kozarstva u uniji (2017/2117 (INI)[1]). U rezoluciji se kao glavni nedostaci sektora ističu nedostatak kvalificirane radne snage, niska profitabilnost bavljenja ovčarstvom te izrazita sezonalnost ovčjih proizvoda na tržištu. Cilj rezolucije je poticanje donošenja mjera poljoprivredne politike koje će omogućiti opstojnost i napredak te grane stočarstva (HAPIH 2020.).



Grafikon 2.2. Broj ovaca u Europskoj uniji u razdoblju između 2008. i 2018. godine. Podatci obuhvaćaju 28 država članica Europske unije.

Izvor: FAO 2018. – pristup 03.03.2020.

Kao što je već napomenuto, proizvodnja mesa i mlijeka čine većinu ovčarske proizvodnje u svijetu. U proizvodnji ovčjeg mesa po kontinentima prednjači Azija (52,4%), potom Afrika (20,3%), Oceanija (12,3%), Europa (11,9%) te Amerika (Sjeverna, Srednja i Južna) (4,2%). U proizvodnji ovčjeg mlijeka vodeća je Azija s 46,3% udjela u ukupnoj proizvodnji, potom slijede Europa (29,8%), Afrika (23%) te Amerika (Sjeverna, Srednja i Južna) s 0,9%. U Tablici 2.1. nalazi se popis država koje su dominirale u proizvodnji mesa i mlijeka (izražena u tonama) u 2018. godini.

[1]INI - Samoinicijativni postupak (*engl. Own-initiative procedure*)

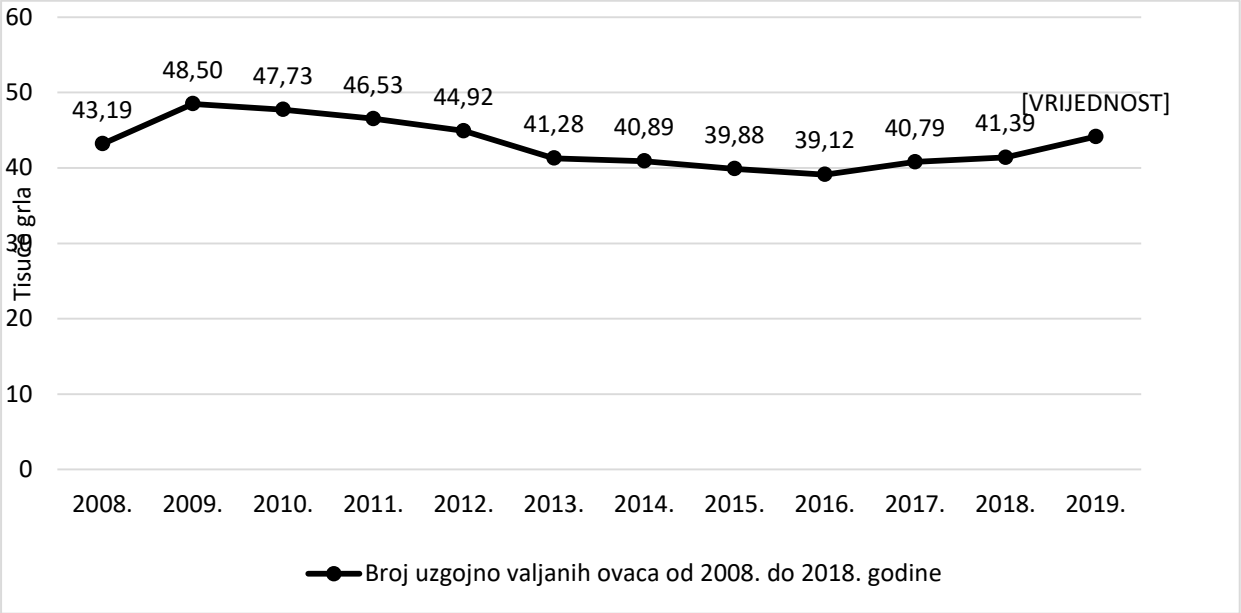
Tablica 2.1. Top pet država u svijetu i Europskoj uniji u proizvodnja mesa i mlijeka.

Proizvodnja mesa (izraženo u tonama)				Proizvodnja mlijeka (izraženo u tonama)			
Svijet		Europska unija		Svijet		Europska Unija	
Kina	2,422,857	Ujedinjeno Kraljevstvo	289,000	Turska	1,446,271	Grčka	753,819
Australija	735,009	Španjolska	119,642	Kina	1,180,276	Rumunjska	626,145
Novi Zeland	470,813	Francuska	102,010	Grčka	753,819	Španjolska	544,541
Turska	362,560	Rumunjska	71,857	Sirija	647,311	Italija	524,717
Alžir	325,008	Irska	67,112	Rumunjska	626,145	Francuska	323,758

Izvor: FAO 2018. – pristup 24.09.2020.

2.2. Ovčarstvo u Republici Hrvatskoj

Prema Mioču i sur. (2007.) u Hrvatskoj se ovce uzgajaju još od dolaska Ilira pa sve do danas. Prema izvješću Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (2020.), ukupan broj ovaca na kraju 2019. godine iznosio je 657,197 (porast za 3,5% u odnosu na 2018. godinu). Najveći broj ovaca se nalazi na područjima Zadarske (113,133), Ličko-senjske (83,299) te Bjelovarsko bilogorske županije (60,249) (Ministarstvo poljoprivrede 2020.). Od ukupnog broja ovaca, broj uzgojno valjanih grla iznosio je 44,158, (porast za 7% odnosu na 2018. godinu). Grafikon 2.3. prikazuje kretanje ukupnog broja uzgojno valjanih ovaca u RH od 2008. do 2019. Od ukupno 44,158 uzgojno valjanih grla čak 80% uzgaja se na priobalju i otocima s obzirom da se na tom području provodi tradicijski uzgoj ovaca te je proizvodnja mesa i mlijeka vrlo izražena. Devet izvornih hrvatskih pasmina obuhvaćeno je selekcijskim radom, a to su: istarska ovca, creska ovca, krčka ovca, rapska ovca, dubrovačka ruda, paška ovca, dalmatinska pramenka, cigaja, te lička pramenka. Također, u provedbu uzgojno selekcijskog rada je uključeno i osam inozemnih pasmina a to su: lacaune, solčavsko-jezerska ovca, romanovska ovca, istočnofrizijska ovca, suffolk, njemački merino (merinolandschaf) i ille de france (MP 2020.).

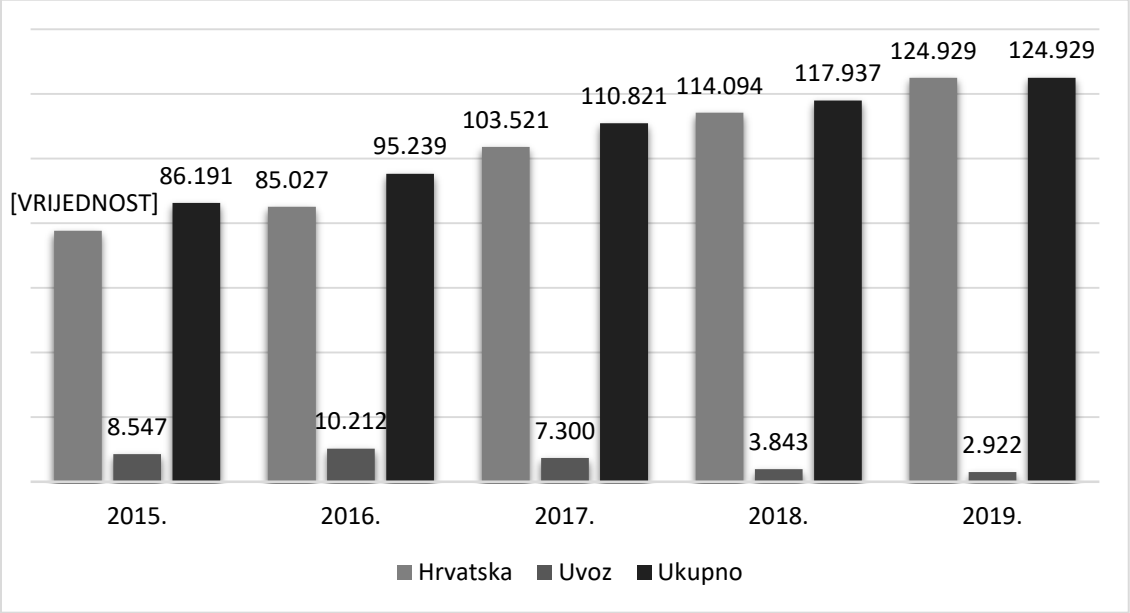


Grafikon 2.3. Kretanje ukupnog broja uzgojno valjanih ovaca
Izvor: MP i HAPIH 2020. – pristup 03.09.2020.

U Hrvatskoj se ovce primarno uzgajaju za proizvodnju mesa tj. janjetine, a u znatno manjoj mjeri za proizvodnju mlijeka, dok ciljanog uzgoja za proizvodnju vune niti nema već se vuna javlja kao nusproizvod u proizvodnji mesa i mlijeka (Antunović i sur. 2012.). Tradicijski, meso janjadi se prodaje kao cijeli trup, međutim u zadnje vrijeme postoji potražnja i za konfekcioniranim mesom. Mlijeko se uglavnom prerađuje u sir i to na gospodarstvima gdje se proizvodi ili u siranama (mljekarama). Prema navodima HAPIH-a (2020.) broj klasiranih trupova na liniji klanja raste u posljednje vrijeme (povećanje za 31% između 2015. i 2019. godine). Najzastupljenija kategorija su trupovi ovaca mlađih od 12 mjeseci (L kategorija). Njihov udio u ukupnom broju razvrstnih trupova iznosi 97,59%. Unutar kategorije L najzastupljeniji su janjeći trupovi lakši od 13 kg (lakša janjad) te njihov udio iznosi 79,92%.

U Grafikonu 2.4. navedeni su podaci o broju klasiranih ovčjih trupova porijeklom iz Republike Hrvatske i iz uvoza. Iz podataka se može vidjeti vidjeti trend smanjenja broja trupova porijeklom iz uvoza te povećanje broja trupova porijeklom iz Republike Hrvatske. U Republici Hvatskoj 2018. godine proizvedeno je 5270 tona mesa (FAO 2018.).

Prema procjenama Ministarstva poljoprivrede (2020.), uz sav tradicijski, gospodarski, sociološki i etnološki značaj, ovčarstvo kod nas još uvijek nije doseglo svoj vrhunac.



Grafikon 2.4**.** Ukupan broj klasiranih ovčjih trupova porijeklom iz Republike Hrvatske i uvoza

Izvor: Ministarstvo poljoprivrede 2020. - pristup 03.09.2020.

2.3. Pasmine ovaca

2.3.1. Istočnofrizijska ovca

Istočnofrizijska ovca (Slika 2.1.) je mliječna pasmina porijeklom iz pokrajine Ostfriesland koja se nalazi na granici između Njemačke i Nizozemske. Smatra se jednom od najplodnijih i najmlječnijih ovaca u svijetu (Mioč i sur. 2007.). Zbog tih odlika često se križa s drugim pasminama kako bi se povećala plodnost i mliječnost kod pasmina uzgajanih za proizvodnju mesa ili mlijeka.

Neke karakteristike koje ova pasmina posjeduje, a izdvaja ju od ostalih pasmina, su: šutost oba spola, te obraslost dijela sjedne kosti, repa, glave i donjih dijelova nogu dlakom. Trup je širok i dubok, srednje dug s lijepo zaobljenim rebrima, dok je vrat srednje dug, snažan i mišićav. Sapi su blago nagnute, duge i široke, te s obzirom da se radi o mliječnoj pasmini, vime je razvijeno sa izraženim sisama. U tablici 2.1. navedene su poželjne karakteristike istočnofrizijske ovce.

Tablica 2.1. Poželjne tjelesne mjere i proizvodne osobine istočnofrizijske ovce.

Osobina	Ovce	Ovnovi
Visina grebena (cm)	60 – 70	70 – 80
Tjelesna masa (kg)	60 – 75	90 – 110
Plodnost (%)	180 – 250	
Proizvodnja mlijeka (L)	250 – 400	
Tjelesna masa janjadi (kg) u dobi 4 mjeseca	35 – 40	
Vuna (µm)	36 – 42	
Vuna (kg)	4,0 – 4,5	4,0 – 6,0

Izvor: Mioč i sur. 2011.



Slika 2.1. Istočnofrizijska ovca
Izvor: B.Mioč

2.3.2. Safolk (Suffolk)

Safolk (Slika 2.2.) je engleska mesna pasmina ovaca, nastala u pokrajini Suffolk križanjem rogatih, nisko proizvodnih ovaca pasmine norfolk sa sautdaun ovnovima (Mioč i sur. 2007.). Od izvornog engleskog safolka nastali su ostali tipovi kao što su: francuski safolk, novozelandski safolk, njemački, švicarski, itd. Postoje tri tipa safolka, a to su: crni, bijeli i smeđi, od kojih je crni zastupljen u Republici Hrvatskoj.

Odlike mesnih pasmina, pa tako i safolka, su razvijen tjelesni okvir kvadratičnog izgleda, te naglašena širina trupa. Odlikuje ga mišićavost sa širokim plećkama, dok su prsa široka, duga i duboka sa zaobljenim rebrima. Trup i stražnji dio trupa je širok, mišićav i dug što se pruža na noge, koje su jake i čvrste. Zbog dobre konformacije trupa, ovnovi se križaju s drugim pasminama kako bi se poboljšala mesnatost. S obzirom na veliku porodnu masu janjadi, koja se kreće od 4,9 kg do 5,9 kg, pogoduje im činjenica da je glava manja od trupa. U Tablici 2.2. navedene su poželjne proizvodne karakteristike safolka.

Tablica 2.2. Poželjne tjelesne mjere i proizvodne osobine pasmine safolk.

Osobina	Ovce	Ovnovi
Visina grebena (cm)	72 – 78	80 – 90
Tjelesna masa (kg)	65 – 80	90 – 120
Plodnost (%)	150 - 180	
Tjelesna masa janjadi (kg) u dobi 3 mjeseca	35 – 40	
Vuna (µm)	30 – 34	
Vuna (kg)	3,0 – 4,0	4,0 – 5,0

Izvor: Mioč i sur. 2011.



Slika 2.2. Safolk pasmina
Izvor: B. Mioč

2.3.3. Travnička pramenka

Travnička pramenka (Slika 2.3.) pripada kombiniranoj skupini pasmina koje se koriste za proizvodnju mesa i mlijeka. Nastala je na području Travnika (Bosna i Hercegovina), te se posebice uzgaja na području planine Vlašić, pa se još naziva i vlašićka ili dubska pramenka. Kako navode Mioč i sur. (2007.) procijenjeno je da je između 1992. i 1993. godine u Hrvatsku dopremljeno oko 10,000 grla travničke pramenke, koja se danas najviše uzgaja na područjima Like i zapadne Slavonije.

Okvirom je krupnija od ostalih sojeva pramenki, te zbog kasnozrelosti svoj potpuni tjelesni razvitak postiže između treće i četvrte godine (Pavić i sur. 1999.). Ovnovi i ovce mogu biti šuti ili

rogati, te imaju srednje razvijenu crnu ili bijelu glavu s polustršećim crnim ušima, a duž čela do nozdrva im se pruža bijela linija. Greben im je izražen te prosječne visine oko 66,76 cm, leđna linija je ravna i pravilna, dok je vrat slabije tj. osrednje mišićav i dug, a prsa su uska i duboka. Tijelo im je prekriveno runom, no iznimka su donji dio vrata, trbuh i donji dijelovi nogu koji nisu prekriveni vunom, već gustom dlakom. U Tablici 2.3. navedene su poželjne proizvodne karakteristike travničke pramenke.

Tablica 2.3. Poželjne tjelesne mjere i proizvodne osobine travničke pramenke.

Osobina	Ovce	Ovnovi
Visina grebena (cm)	66 – 70	73 – 78
Tjelesna masa (kg)	70 – 75	82 – 90
Plodnost (%)	120 – 150	
Proizvodnja mlijeka (L)	130 – 180	
Tjelesna masa janjadi u dobi od 45 do 60 dana (kg)	15 – 18	
Vuna (µm)	42 – 43	
Vuna (kg)	2,5 – 3,0	3,5 – 4,5

Izvor: Mioč i sur. 2011.



Slika 2.3. Travnička pramenka
Izvor: V. Držaić

2.4. Karakteristike janjećeg mesa

U brojnim državama ovce se uzgajaju primarno zbog proizvodnje mesa. Meso je vrlo bitan izvor životinjskog proteina u ljudskoj prehrani, a ovčje tj. janjeće meso sadrži gotovo sve hranjive sastojke, aminokiseline, bjelančevine, vitamine i minerale koji su potrebni ljudskoj prehrani (Mioč i sur. 2007.). Na kvalitetu trupa i mesa značajan utjecaj imaju genetski i okolišni čimbenici. Najvažniji čimbenici kvalitete mesa su pasmina, spol, dob, anatomski položaj mišića, sustav uzgoja, hranidba, stupanj utovljenosti, sezona uzgoja, predklaonički postupci sa životinjama, uvjeti i postupci s mesom nakon klanja (manipulacija nakon klanja, uvjeti čuvanja), itd. Osnovni kemijski sastav, boja i pH vrijednost mesa, te sastav masnih kiselina su neki od osnovnih pokazatelja kakvoće janjećeg mesa. U Tablici 2.4. prikazan je osnovni kemijski sastav i pH mesa utvrđen na dugom leđnom mišiću *(lat. m.longissimus dorsi)* creske janjadi zaklane pri tjelesnoj masi od 20 kg u prosječnoj dobi od 90 dana.

Tablica 2.4. Kemijski sastav i pH mesa creske janjadi u dugom leđnom mišiću.

Pokazatelj	**%**
Voda	73,68
Suha tvar	26,33
Bjelančevine	21,45
Mast	3,45
Pepeo	1,31
pH	6,28

Izvor: Vnučec i sur. 2014.

Boja mesa ovaca i ovnova (ovčetina) je svjetlije do tamno crvene boje, specifičnog okusa te izraženog mirisa, posebice kod ovnova. Janjeće meso je svjetlije boje, sadrži manje intramuskularne masnoće, ima aromatičan miris te ugodan okus (Bedeković i sur. 2007.). Uz Sadržaj masnoće u mesu se povećava se sa starošću životinje, a mast (lipidi) u trupu se nakuplja: supkutano (potkožno), intermuskularno (između mišića), intramuskularno (unutar mišića) te unutar tjelesnih šupljina (trbušna, zdjelična i bubrežna). Lipidi janjećeg mesa mogu biti prisutni u obliku triglicerida, fosfolipida, stearida i sterina, a osobito su cijenjeni intramuskularni lipidi koji sadrže više fosfolipida (Woods i sur. 2009.). Zastupljenost pojedinih masnih kiselina u intramuskularnoj, intermuskularnoj i supkutanoj masti navedeni su u Tablici 2.5..

Tablica 2.5. Sadržaj masnih kiselina (g/100g^{-1} od ukupne količine) u supkutanoj, intermuskularnoj i intramuskularnoj masti sisajuće janjadi Churra pasmine.

Područje pohrane masti	Supkutana mast	Intermuskularna mast	Intramuskularna mast
Zasićene masne kiseline	48,60	50,3	40,47
Mononezasićene masne kiseline	44,82	43,29	39,90
Polinezasićene masne kiseline	6,84	6,76	19,65
n-3	0,82	0,82	3,09
n-6	3,32	3,39	14,36

n-3- Omega 3 masne kiseline*; n-6*-Omega 6 masne kiseline
Izvor: Osorio i sur. 2007.

2.5. Karakteristike ovčjeg mlijeka

Prema Pravilniku o mlijeku i mliječnim proizvodima (NN 20/09), mlijeko je prirodni sekret mliječne žlijezde životinja iz uzgoja, dobiven jednom ili više mužnji, kojem ništa nije dodano niti oduzeto. Sastav ovčjeg mlijeka se uvelike razlikuje od kravljeg u količini mliječne masti, koja je veća u ovaca, količini bjelančevina, mliječnog pepela te suhe tvari. Kemijski sastav ovčjeg mlijeka varira tijekom laktacije, te ovisi o nekoliko faktora kao što su pasmina, dužina i stadij laktacije, dob ovaca, tehnika mužnje, interval između mužnji i broj mužnji (Antunac i Havranek 1999.). U Tablici 2.6. prikazan je kemijski sastav ovčjeg mlijeka. Bitan sastojak mlijeka je mliječna mast. Mliječna mast je mješavina triglicerida koji su sastavljeni od glicerola i masnih kiselina. Lipidi u mlijeku služe kao izvor energije i izvor esencijalnih masnih kiselina (linolenska), te imaju bitan učinak na okus i aromu mlijeka.

Tablica 2.6. Kemijski sastav ovčjeg mlijeka.

Sastav	g/100 g
Vlaga	82,9
Mliječna mast	5,9
Mliječni pepeo	0,9
Laktoza	4,8
Protein	5,5
Kazein	4,7

Izvor: Balthazar i sur. 2014.

2.6. Diacilglicerol O-aciltransferaza (DGAT1)

Diacilglicerol O-aciltransferaza 1 (DGAT1) je pojam koji se u literaturi koristi za definiranje enzima i gena.

Diacilglicerol O-aciltransferaza 1 je mikrosomalni enzim čija je uloga katalizirati zadnji korak u sintezi triacilglicerola koristeći diacilglicerol i acil-CoA kao supstrate (Cases i sur. 1998.). Trigliceridi sintetizirani pomoću DGAT1 enzima potom se pohranjuju u citosol u obliku lipidnih kapljica ili u druge organe kao što su jetra i tanko crijevo (Chen i Farese 2005.).

DGAT1 gen u ovaca je smješten je na devetom kromosomu. Njegova uloga je kodiranje enzima diacilglicerol O-aciltransferaze. Najveći stupanj ekspresije gena DGAT1 je u adipoznom tkivu i tankom crijevu (Chen i Farese 2005.). Kod goveda je ovaj gen smješten na četrnaestom kromosomu i predstavlja kandidatni gen koji ima utjecaj na proizvodnju mlijeka, posebice na sadržaj mliječne masti. Međutim, kod ovaca još uvijek je nedovoljno pojašnjen utjecaj tog gena na proizvodne karakteristike mesa i mlijeka.

2.6.1. Utjecaj DGAT1 gena na meso

Potaknuti poznatom ulogom enzima DGAT1 u sintezi triglicerida, znanstvenici su nastojali utvrditi utjecaj istoimenog DGAT1 gena na količinu i kvalitetu mesa kod preživača. Najviše je istraživanja za sada provedeno kod goveda. Npr. povezanost DGAT1 gena i sadržaja masti u govođem mesu istražili su Sorensen i sur. (2006.) na uzorcima dugog leđnog mišića *(lat. m. longissimus dorsi),* te polutetivastog mišića *(lat. semitendinosus)* kod bikova Holstein i Charolais pasmine. U genotipa KK naspram genotipa KA i AA utvrđen je veći sadržaj masti i veća mramoriranost u oba mišića Holstein bika, uz povećanu aktivnost DGAT1 gena u dugom leđnom mišiću. Za razliku od goveda kod gdje je uloga DGAT1 gena bila predmetom mnogih istraživanja, relativno je malo istraživanja koja su izučavala utjecaj DGAT1 gena na kvalitetu i sastav ovčjeg, odnosno janjećeg mesa.

Noshahr i Rafat (2014.) su u istraživanju provedenom na mesnoj pasmini Moghani dokazali da postoji statistički značajan ($P<0,05$) utjecaj genotipa na masu toplog trupa i randman (pozitivan učinak alela C). Mohammadi i sur. (2013.) proveli su istraživanje na masnotrtičnim pasminama Lori-Bakhtiari i Zel , te su utvrdili da alel C ima pozitivan učinak na količinu trtične masti i debljinu supkutane masti na leđima. Kod Akkaraman pasmine nije pronađen genotip TT, no pronađeni su genotipovi CC i CT, pri čemu je genotip CT imao u prosjeku veću porodnu masu u odnosu na CC genotip (Bayram i sur. 2019.). Alel T kod Texel pasmine imao je pozitivan učinak na masu nakon odbića, a alel C genotipa na masu toplog trupa (Armstrong i sur. 2018.). Xu i sur.

(2008.) su ustanovili statistički značajnu povezanost između genotipa i kvalitete mesa kineskih pasmina ovaca, točnije, da ovce sa genotipom TT imaju bolju mramoriranost mesa, veći sadržaj intramuskularne masti, manji otpor mesa na sječenje te manji kapaoni gubitak vode. Kao što je vidljivo iz napisanog, dosadašnji rezultati istraživanja koja su provedena s ciljem izučavanja utjecaja DGAT1 gena na svojstvima prinosa i kvalitete, upućuju kako alel C ima pozitivan učinak na svojstva prinosa mesa i zamašćenja trupa, a alel T na svojstva važna sa stanovišta kakvoće mesa.

2.6.2. Utjecaj DGAT1 gena na mlijeko

Obzirom na već spomenutu važnost enzima DGAT1 u sintezi glicerida, gen DGAT1 se smatra važnim kadidatnim genom za veći broj svojstava svojstava važnih u proizvodnji mlijeka (Xu i sur. 2008; Scata i sur. 2009.). U istraživanju Tabaran i sur. (2014.) ustanovljeno je kako polimorfizam na egzonu 17 DGAT1 gena kod Turcana pasmine, nije imao nikakav utjecaj na količinu mliječne masti u mlijeku. Genotip CC kod Assaf pasmine pokazao je veće količine laktoze, maslačne kiseline i palmitinske kiseline u mlijeku naspram jedinki s genotipom CT (Dervishi i sur. 2015.), međutim nije dokazana povezanost sa količinom mliječne masti. Sekvencionirajući DGAT1 gen Scata i sur. (2009.). su ustanovili statistički značajke supstitucijske učinke alela (jednog od istraživanih pojedinačnih polimorfizma nukleotida DGAT1 gena) na prinos mlijeka, postotak proteina i postotak mliječne masti, ipak obzirom da su koristili drugi oblik genotipizacije, rezultate njihova rada je teško povezati sa prethodno spomenutim istraživanjima. Iako u istraživanju Dervishi i sur. (2015.) nije pronađena statistički značajna veza između genotipa i većeg broja analiziranih svojstava, njihovi tabelarno prezentirani rezultati sugeriraju na mogućnost postojanja pozitivnog utjecaja alela C na komponente suhe tvari mlijeka, a negativan učinak na količinu proizvedenog mlijeka.

3. Materijali i metode

3.1. Životinje korištene u istraživanju

Istraživanje na polimorfnosti DGAT1 gena provedeno je tijekom lipnja i srpnja 2020. godine, dok su uzorci prikupljeni tijekom 2015. i 2016. godine na području Republike Hrvatske. Korišteno je 30 uzoraka DNK izolirane iz krvi travničke pramenke, 29 uzoraka DNK izoliranih iz dlake istočnofrizijske ovce, te 27 uzoraka pasmine safolk također izoliranih iz dlake.

3.2. Izolacija genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNK)

Iz prikupljenih uzoraka dlake i krvi izolirana je genomska deoksiribonukleinska kiselina (DNK) korištenjem GenElute® Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit-a (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Prije početka postupka izolacije DNK priređene su otopine potrebne u postupku izolacije. Koncentrat otopine za ispiranje DNK razrijeđen je s 80 mL 96% etanola, dok je sadržaj (10 mg) jedne bočice proteinaze K otopljen u 0,5 mL Milli Q vode (Sigma-Aldrich) kako bi se priredila otopina proteinaze K od 20 mg/mL.

3.3. Postupak izolacije DNK iz dlake

Izolacija DNK iz korijena dlake napravljena je po modificiranim uvjetima proizvođača Sigma (http://www.sigmaaldrich.com). Protokol za izolaciju DNK iz dlake bio je sljedeći:

1. Priprema uzorka za izolaciju
   a) od svakog uzorka korišteno je minimalno 50 dlaka kojima je laboratorijskim škaricama odrezan korijen i stavljen u tubice od 1,5 mL.
2. Razgradnja korijena dlake
   a) u 1,5 mL tubicu s pripremljenim korijenom dlake dodano je 180 µL Lysis otopine T (B6678) i 20 µL otopine proteinaze K;
   b) smjesa je snažno protresena te stavljena na inkubaciju tijekom noći na temperaturu od 55°C uz tresenje na 600 rcf na uređaju Eppendorf Thermomixer comfort.
3. Raspadanje stanice (engl. Lyse cells)
   a) slijedeće jutro smjesi je dodano 200 µL Lysis otopine C (B8803), nakon čega je otopina snažno protresena u trajanju od 15 sekundi.
4. Priprema kolona
   a) u tubice s kolonama od 2 mL (GenElute Miniprep Binding Column) dodano je 500 µL otopine za pripremu kolona, a zatim su tubice centrifugirane u trajanju od 1 minute na 12 000 rcf;

b) nakon centrifugiranja tekući sadržaj iz tubica je odbačen i kolone su spremne za nastavak izolacije DNK.

5. Priprema za vezivanje

a) u tubu s uzorkom dodano je 200 µL hladnog 96% etanola (čuvan na -20°C), smjesa je snažno protresena u trajanju od 10 sekundi sa svrhom dobivanja homogene smjese.

6. Premještanje smjese lizata

a) s pipetom od 1 000 µL sav sadržaj lizata iz 1,5 mL tubica je premješten u prethodno pripremljene 2,0 mL tubice s kolonama;

b) zatim je uslijedilo centrifugiranje 1 minutu na 6 600 rcf;

c) po završetku centrifugiranja kolone su prebačene u čiste 2,0 mL tubice.

7. Prvo ispiranje

a) u svaku kolonu dodano je 500 µL otopine za ispiranje (Wash Solution), nakon čega je uslijedilo centrifugiranje 1 minutu na 6 600 rcf;

b) po završetku centrifugiranja kolone su prebačene u čiste 2,0 mL tubice.

8. Drugo ispiranje

a) ponovno je u svaku kolonu dodano 500 µL otopine za ispiranje nakon čega je uslijedilo centrifugiranje od 3 minute na 14 000 rcf;

b) po završetku centrifugiranja kolone su prebačene u čiste 2,0 mL tubice.

9. Otapanje DNK

a) u svaku kolonu dodano je 80 µL otopine za otapanje DNK (Elution Solution), nakon inkubacije u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 1 minutu na 6 600 rcf;

b) nakon toga postupak je ponovljen s ciljem dobivanja veće količine DNK.

Izolirana DNK je do upotrebe bila pohranjena u zamrzivaču na temperaturi od -20°C.

3.4. Postupak izolacije DNK iz krvi

Prije početka izolacije DNK uzorci krvi su odmrznuti na sobnoj temperaturi i temeljito izmiješani. DNK je izolirana iz bijelih krvnih stanica (leukocita). U tubice od 1,5 mL odpipetirano je 200 µL krvi. Sa svrhom dobivanja leukocita u tubice s uzorkom krvi, odpipetirano je 800 µL 1xTE pufera, nakon čega je uslijedilo snažno tresenje te centrifugiranje 1 minutu na 12 000 rcf. Nakon centrifugiranja leukociti su ostali zalijepljeni za dno tubice, a sav tekući sadržaj je odbačen. Postupak je ponovljen šest puta sve dok pufer nije bio proziran, a leukociti bijele do blago žućkaste boje. Peletu leukocita je potom dodano 200 µL otopine za resuspenziju (Resuspension Solution) i 10 µL otopine proteinaze K, nakon čega je uslijedilo snažno tresenje. Uzorcima je potom dodano 200 µL Lysis otopine C (B8803), snažno su protreseni i inkubirani 10 minuta na 55°C uz centrifugiranje na 700 rcf. Daljnji koraci izolacije DNK bili su identični onima opisanim za izolaciju DNK iz dlake.

3.5. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Umnožavanje ciljne sekvence DNK sedamnaestog egzona DGAT1 gena provedeno je postupkom lančane reakcije polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction; PCR) prema protokolu proizvođača s EmeraldAmp® MAX HS PCR Master Mix (TaKaRa Bio Europe). PCR je proveden u ukupnom volumenu od 15 µL uključujući:

- 5,4 µL vode slobodne od nukleaza;
- 7,5 µL EmeraldAmp® MAX HS PCR Master Mix;
- 0,45 µL oligonukleotidne početnice prema naprijed (*engl. forward*) 10 µM;
- 0,45 µL oligonukleotidne početnice prema natrag (*engl. reverse*) 10 µM;
- 1,2 µL tj. 50 ng genomske DNK.

U PCR reakciji korišteni su oligonukleotidne početnice (*Metabion International AG*) koje su omogućile amplifikaciju sekvence dijela sedamnaestog egzona DGAT1 gena (GenBank Acc. No. EU178818) duljine 309 baznih parova:

- oligonukleotidna početnica prema naprijed: 5'- GCATGTTCCGCCTCTGG -3';
- oligonukleotidna početnica prema natrag: 3'- TCAGGGGTGTTGGACTCC -5'.

PCR reakcija je rađena na mastercycleru (Eppendorf) prema sljedećem temperaturno-vremenskom okviru:

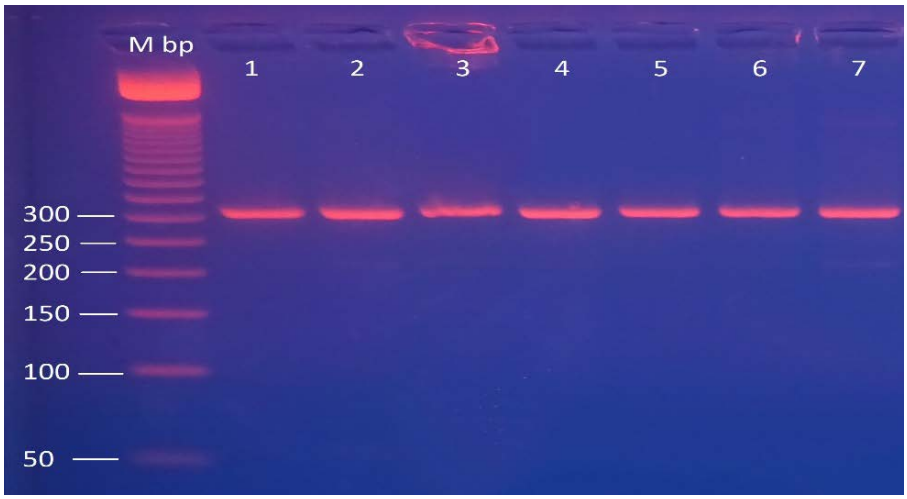
- reakcija aktivacije Taq polimeraze na 98˚C/3 minute;
- denaturacija 98˚C/10 sekundi,
- prilijeganje oligonukleotidnih početnica 57,5˚C/30 sekundi;
- produljenje DNK lanca 72˚C/20 sekundi;

35 ciklusa umnažanja ciljnog DNK odsječka

- krajnje produljenje multiplicirane željene sekvence DNK na 72˚C/5 minuta;
- hlađenje na 4^{o}C.

Kontrola uspješnosti amplifikacije PCR produkata vršena je na 1% agaroznom gelu pomoću gel elektroforeze. Za izradu gela korišteno je 0,75 g agaroze i 75 mL 1x TBE pufera (0,5 M Tris baza, 0,5 M borna kiselina, 10 mM EDTA), zagrijanih do ključanja u koje je nakon hlađenja gela na 60ºC dodano oko 3 µL etidijevog bromida. U jažice na gelu dodano je 5 µL PCR produkta paralelno sa standardom od 50 parova baza. Prilikom stavljanja uzoraka u jažice na gelu nije korišten aplikacijski pufer budući da ga sadrži korišteni EmeraldAmp® MAX HS PCR Master Mix (TaKaRa). Elektroforeza je trajala 120 minuta na 80 V. Vizualizacija (Slika 3.1.) je provedena

pomoću etidij bromida (EtBr) osvjetljavanjem gela ultraljubičastim (UV) svjetlom na UV transiluminatoru (Biorad).



Slika 3.1. Amplifikacija sedamnaestog egzona DGAT1 gena duljine 309 baznih parova (bp) lančanom reakcijom polimeraze (PCR) u ovaca. M – standard razmaka 50 bp, 1 – 7 PCR amplificirani produkt.

3.6. Determinacija polimorfizama DGAT1 gena

Determinacija DGAT1 alelnih varijanti obavljena je cijepanjem PCR produkta s *AluI* restrikcijskom endonukleazom (Promega). Reakcijski miks za restrikcijsku razgradnju PCR produkata imao je ukupni volumen od 20 µL, sadržavajući 10 µL PCR produkta i 10 µL reakcijskog miksa koji se sastojao od sljedećih komponenti:

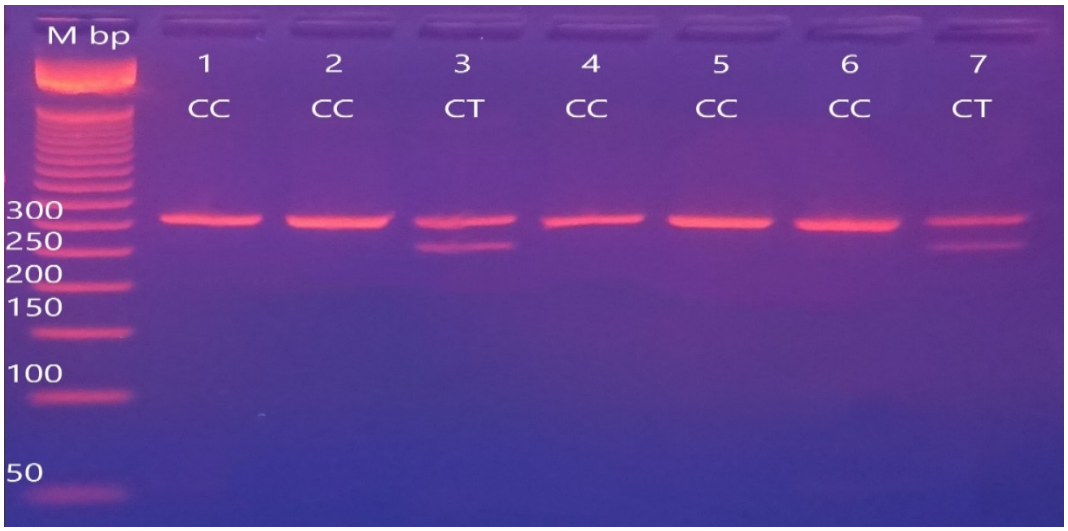
- 7,70 µL demineralizirane vode;
- 2,0 µL 10 x pufer B;
- 0,2 µL 0,1% BSA;
- 0,1 µL *AluI* 10U/µL.

Nakon miješanja 10 µL reakcijskog miksa i 10 µL PCR produkta uzorci su stavljeni na inkubaciju u mastercycleru (Eppendorf) u trajanju od 16 sati na 37^{o}C. Kontrola uspješnosti restrikcijskog cijepanja PCR produkata s *AluI* restrikcijskom endonukleazom vršena je na 4% agaroznom gelu pomoću elektroforeze. U jažice na gelu apliciran je cjelokupan sadržaj nakon inkubacije, odnosno 20 µL, paralelno sa standardom od 50 parova baza.

Genotipizacijom (Slika 3.2.) uočeni su slijedeći fragmenti DGAT1 gena:

- CC (309 bp)

- CT (309 i 272 bp)



Slika 3.2. Gel restrikcijske razgradnje PCR produkta DGAT1 gena ovaca
i primjer dobivenih genotipova (CC i CT).
M - standard razmaka 50 baznih parova; 1 – 7 - oznake uzoraka.

3.7. Statistička analiza

Statistička obrada podataka (utvrđivanje frekvencija alela i genotipova, očekivane heterozigotnosti i odstupanja populacija od Hardy-Weinbergove ravnoteže) provedena je u R programskom okruženju (R Core Team 2020.) korištenjem paketa “genetics” (Warnes 2019.) i ''HardyWeinberg'' (Graffelman 2015.). Grafički prikaz testa odstupanja populacija od Hardy-Weinbergove ravnoteže (*engl. ternary plot*), izvršen je “HWTernaryPlot” funkcijom (Graffelman i Morales-Camarena 2008.) integriranom unutar paketa ''HardyWeinberg''.

4. Rezultati istraživanja i rasprava

Od inicijalno korištenih 30 uzoraka po pasmini, uspješno je genotipizirano 29 uzoraka (97%) istočnofrizijske ovce, 27 uzoraka (90%) safolka i 30 uzoraka (100%) travničke pramenke. DGAT1 gen pokazao se polimorfan u populaciji safolka i travničke pramenke, dok je u populaciji istočnofrizijske ovce bio monomorfan. U Tablici 4.1. prikazane su frekvencije alela i genotipova DGAT1 gena i populacijski genetski parametri istočnofrizijske ovce, safolka i travničke pramenke.

Tablica 4.1. Frekvencija alela i genotipova DGAT1 gena i populacijski genetski parametri istočnofrizijske ovce, safolka i travničke pramenke.

Lokus	Pasmine	*f alela*		*f genotipova*			*PIC*	H_e	HWE P-značajnost
		C	T	CC	CT	TT			
DGAT1	Istočnofrizijska ovca (n=29)	1,00	0	1,00	0	0	0	0	1
	Safolk (n=27)	0,96	0,04	0,93	0,07	0	0,069	0,077	0,842
	Travnička pramenka (n=30)	0,93	0,07	0,87	0,13	0	0,117	0,130	0,700

n-broj jedinki; *f*-frekvencije; *PIC*-indeks polimorfnosti markera; *He*-očekivana heterozigotnost; *HWE*-Hardy-Weinbergova ravnoteža.

Pronalazak samo jednog C alela na DGAT1 lokusu kod Istočnofrizijske ovce upućuje na mogućnost fiksacije alela C u ovoj populaciji. U opsežnom istraživanju kojeg su proveli Dervishi i sur. (2015.) i protom proveli istovjetni oblik genotipizacije (PCR-RFLP, egzon 17, AluI restrikcijski enzim) utvrđena je također izrazita prevalencija alela C kod svih istraživanih mliječnih pasmina (Assaf (*f(C)* = 0,96), Latxa (*f(C)* =0,92) i Manchega (*f(C)* =0,83)). U njihovom istraživanju je lokus DGAT1 bio monomorfan samo kod pasmine Churra lebrijana (kombinirani tip). Obzirom na utvrđeni pozitivan učinak C alela na komponente suhe tvari ovčjeg mlijeka (Dervishi i sur. 2015.), izrazita prevalencija alela C kod mliječnih pasmina je vjerojatno posljedica odgovora na selekciju na kvalitativna svojstva mlijeka. Istraživani lokus u ovom istraživanju je kod safolka i travničke pramenke bio polimorfan ali također sa izrazito visokom prevalencijom alela C (>90%). Dobiveni rezultati su u suglasju s rezultatima Meena i sur. (2015.) koji su u istraživanju provedenom na mesnoj pasmini Malpura ovaca utvrdili frekvenciju alela C (0,92) i alela T (0,08). Rezultati su također suglasni sa rezultatima istraživanja Bayrama i sur. (2018.) provedenog na mesnoj pasmini Akkaraman prilikom čega su utvrđene frekvencije alela C (0,96) i alela T (0,04). Utvrđene frekvencije alela C u ovom istraživanju bile su nešto niže od onih koje su utvrdili Dervishi i sur. (2015.) kod većeg broja mesnih i kombiniranih pasmina ovaca kod kojih je također

utvrđena dominacija C alela (*f(C)* = 0,69 – 0,85). Suprotno navedenom, Xu i sur. (2008.) su kod tri mesne autohtone kineske pasmine (Han, Tan i Inner Mongolia) utvrdili manje frekvencije alela C (raspon od 0,26 do 0,38) u odnosu na frekvenciju alela T (rasponu od 0,59 do 0,74). Slično navode i Noshahr i Rafat (2014.) za Moghani pasminu kod koje su frekvencije alela T bile 5 puta veće u odnosu na frekvencju alela C (*f(C) : f(T)* = 0,17 : 0,83).

Monomorfnost gena kod istočnofrizijske pasmine je uvjetovala pojavnost samo jednog genotipa (CC) dok su kod safolka i travničke pramenke uz homozigote (CC) pronađeni još samo heterozigoti (CT). Frekvencije homozigotnih jedinki genotipa CC u populaciji safolka i travničke pramenke iznosile su 0,93 i 0,87, dok su frekvencije heterozigotnih jedinki CT iznosile 0,07 i 0,13.

U istraživanju provedenom na mesnoj pasmini Akkaraman, Bayram i sur. (2018.) su utvrdili prisutnost dva genotipa, CC i CT. Frekvencije CC genotipa iznosile su 0,91 a genotipa CT 0,09 što je približno rezultatima ovog istraživanja. Yang i sur. (2011.) te Mohammadi i sur. (2013.) su u svojim istraživanjima utvrdili pojavnost sva tri genotipa CC, CT i TT. Yang i sur. (2011.) su kod kineskih pasmina Tan, Oula, Ganjia i Qiaoke utvrdili frekvencije genotipa CC od 0,50 do 0,59, frekvencije genotipa CT od 0,22 do 0,38 te frekvencije genotipa TT od 0,03 do 0,26. Dobiveni rezultati se u dobroj mjeri podudaraju sa onima Dervishi i sur. (2015.) i to za sve tri skupine pasmina (mliječni, mesni i kombinirani tip) iako postoje stanovita odstupanja u magnitudi utvrđenih frekvencija što znači da je rangiranje genotipova po utvrđenim frekvencijama istovjetno ali da se apsolutne frekvencije razlikuju. Nasuprot navedenom, u istraživanju povezanosti polimorfizma DGAT1 gena s odlikama trupa mesnih pasmina Zel i Lori-Bakhtiari, Mohammadi i sur. (2013.) utvrdili su frekvencije genotipa CC 0,16 i 0,07, genotipa CT 0,19 i 0,24 te genotipa TT 0,65 i 0,69. Xu i sur. (2009.) su kod tri mesne autohtone kineske pasmine (Han, Tan i Inner Mongolia) pronašli također sva tri genotipa, s tim da je u njihovom istraživanju bila znatno drugačija distribucija genotipova (TC<CC<TT).

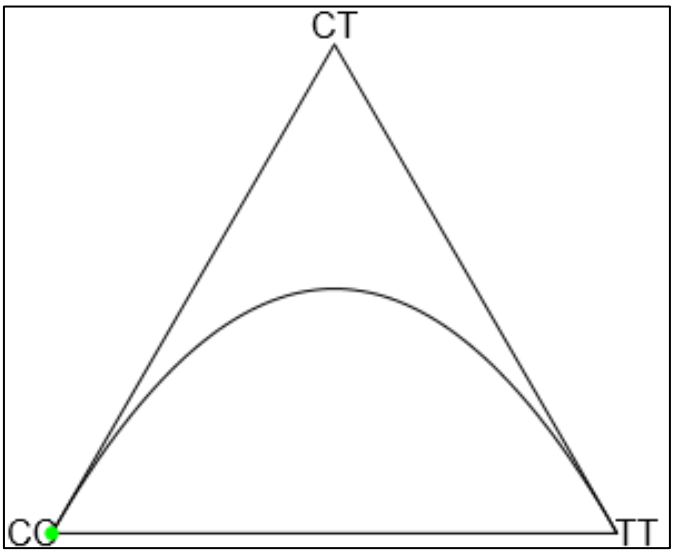
Sukladno utvrđenim frekvencijama alela, očekivana heterozigonst kod travničke pramenke, safolka i istočnofrizijske ovce je bila redom 0,130 0,077 i 0,00. Očekivana heterozigonst (H_e) kod svih triju istraživanih populacija nije se značajno razlikovala od utvrđene, što u pravilu odgovara rezultatima gore navedenih istraživanja gdje su utvrđene frekvencija genotipova bile (*f*(CC)>*f*(CT)>*f*(TT)). Obzirom na viši stupanj polimorfnosti istraživanog lokusa, u istraživanjima Xu i sur. (2009.) i Yang i sur. (2011.) utvrđene su znatno veće vrijednosti očekivane heterozigotnosti koje su se u većini slučajeva značajno razlikovale od utvrđene.

Odstupanje očekivanih od utvrđenih frekvencija genotipova, odnosno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže provjereno je Hi kvadrat testom prilikom čega je utvrđeno je da su sve tri populacije bile u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (Grafikoni 4.1., 4.2., i 4.3.). Postojanje Hardy-Weinbergove ravnoteže na lokusu DGAT1 utvrdili su također i Dervishi i sur. (2015.) i to kod osam od devet istraživanih pasmina ovaca (izuzetak je bio pasmina Ansontana), zatim Mahrous i sur. (2014.) kod tri egipatske pasmine ovaca, te Yang i sur. (2011.) kod pasmina Tan i

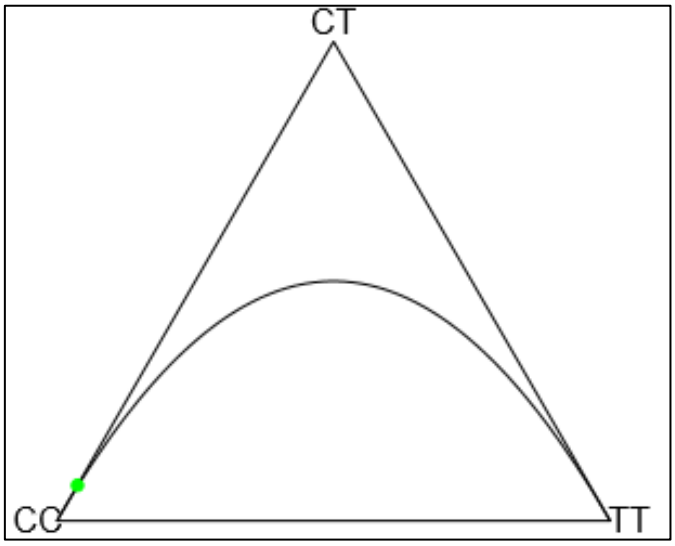
Oula. S druge strane, odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže je utvrđeno kod sve tri kineske pasmine u istraživanju koje su proveli Xu i sur. (2009.), te dvije od četiri kineske pasmine u istraživanju koje su proveli Yang i sur. (2011.). Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže je također utvrđeno kod indijske pasmine Malpura (Meena i sur. 2015.), te kod iranskih pasmina Lori-Bakhtiari i Zel (Mohammadi i sur. 2013.).

Utvrđene frekevencije genotipova i izrazita dominacija C alela u subpopulacijama istraživanih pasmina u Hrvatskoj upućuju na vrlo limitiranu mogućnost selekcije na povećanu frekvenciju alela T koji prema dosadašnjim pronalascima ima pozitivan učinak na kvalitativna svojstva mesa u smislu povećane intramuskularne masti i mramoriranosti mesa, mekoće mesa (manja sila presjecanja), te manjeg kapaonog gubitka vode (Xu i sur. 2009.). S druge strane, za isti alel T je utvrđen negativan učinak na završnu klaoničku masu, randman i zamašćenost trupa (Mohamadi i sur. 2013., Noshahr i Rafat 2014.). Uzimajući u obzir dobivene rezultate (frekvencije genotipova) i rezultate gore navedenih istraživanja, moguće je donekle zaključiti kako je profil DGAT1 gena u istraživanim populacijama ovaca povoljan za svojstva količine, a nepovoljan za svojstva kvalitete proizvedenog janjećeg mesa.

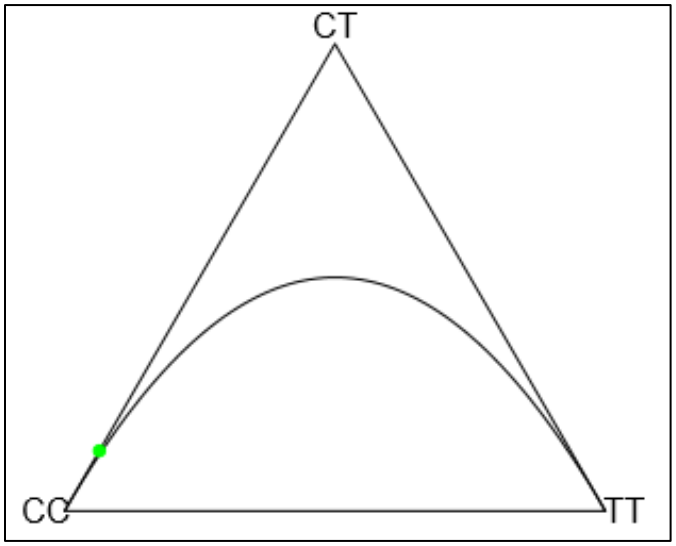
Uvažavajući rezultate dosad provedenih istraživanja po pitanju utjecaja polimorfizma DGAT1 gena na svojstva važna u proizvodnji ovčjeg mlijeka može se zaključiti da je utvrđeni profil DGAT1 gena u istraživanim populacijama povoljniji za kvalitativne nego za kvantitativne osobine ovčjeg mlijeka. Naime, Dervishi i sur. (2014.) su utvrdili pozitivnu vezu C alela sa komponentama suhe tvari mlijeka, a negativnu veza sa količinom proizvedenog mlijeka. Ipak ovdje valja napomenuti kako utvrđene razlike u prosjecima između istraživanih genotipovi nisu bile statistički značajne. U provedenom istraživanju genotip je imao statistički značajan utjecaj samo na sadržaj laktoze i masno-kiselinski sastav mlijeka. Jedinke genotipa CC na DGAT1 lokusu proizvele su više laktoze i imale povoljniji (niži omjer n-6:n-3) odnos masnih kiselina od heterozigotnih jedinki genotipa CT. Scata i sur. (2009.) su proveli opsežno istraživanje sekvencionirajući DGAT1 gen i ustanovili statistički značajke supstitucijske učinke alela (jednog od istraživanih pojedinačnih polimorfizma nukleotida DGAT1 gena) na prinos mlijeka, postotak proteina i postotak mliječne masti. Ipak, u kontekstu ovog rada taj rezultat ide samo u prilog činjenici kako polimorfizam gena DGAT1 utječe na svojstva mliječnosti, ali obzirom na drugačiji oblik genotipizacije nije ga moguće po niti jednoj drugoj osnovi povezati sa rezultatima ovog istraživanja.



Grafikon 4.1.Grafički prikaz testiranja populacije na Hardy-Weinbergovu ravnotežu (Istočnofrizijska ovca).



Grafikon 4.2. Grafički prikaz testiranja populacije na Hardy-Weinbergovu ravnotežu (Safolk).



Grafikon 4.3. Grafički prikaz testiranja populacije na Hardy-Weinbergovu ravnotežu (Travnička pramenka).

5. Zaključak

1. Rezultati provedenog istraživanja upućuju na vrlo malu zastupljenost T alela na lokusu DGAT1 u istraživanim populacijama safolka i travničke pramenke, te potpuno odsustvo istog u populaciji istočnofrizijske ovce.

2. Sve tri istraživane populacije su u Hardy Weinbergovoj ravnoteži po pitanju lokusa DGAT1.

3. Utvrđeni profili istraživanih DGAT1 gena upućuju na vrlo limitiranu mogućnost selekcije kod safolka i travničke pramenke u smjeru alela T koji prema dosadašnjim spoznajama ima pozitivan učinak na nekoliko svojstava važnih sa stanovišta kakvoće janjećeg mesa.

4. Utvrđeni profil DGAT1 gena u populaciji istočnofrizijske ovce sugerira fiksaciju alela C koji ima pozitivan učinak na sadržaj laktoze i masno-kiselinski sastav mlijeka.

5. Opsežnim pregledom literature je utvrđeno kako su polimorfizmi DGAT1 gena, a pogotovo njihov utjecaj na važna svojstva u proizvodnji ovčjeg mesa i mlijeka, još uvijek slabo istraženi kod ovaca. Potrebna su dodatna istraživanja za vjerodostojnu generalizaciju učinaka DGAT1 gena na brojna svojstva od selekcijskog značaja kod ovaca.

6. Literatura

1. Antunac N., Lukač Havranek J. (1999). Proizvodnja, sastav i osobine ovčjeg mlijeka. Mljekarstvo. 49(4): 241-254.

2. Antunović Z., Novoselec J., Klir Ž. (2012). Ovčarstvo i kozarstvo u Republici Hrvatskoj. Krmiva. 54(3): 99-109.

3. Armstrong E., Ciappesoni G., Iriarte W., Da Silva C., Macedo F., Navajas E.A., Brito G., San Julián R., Gimeno D., Postiglioni A. (2018). Novel genetic polymorphisms associated with carcass traits in grazing Texel sheep. Meat Science. 145: 202-208.

4. Bayram D., Akyuz B., Arslan K., Özdemir F., Aksel E.G., Çinar M.U. (2018). DGAT1, CAST and IGF-I gene polymorphisms in Akkaraman lambs and their effects on live weights up to weaning age. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. 25(1).

5. Bedeković D., Mioč B., Pavić V., Vnučec I., Prpić Z., Barać Z. (2007). Klaonički pokazatelji creske, paške i janjadi travničke pramenke. Stočarstvo 61(5): 359-370.

6. Cases S., Smith S.J., Zheng Y.-W., Myers H.M., Lear S.R., Sande E., Novak S., Collins C., Welch C.B., Lusis A.J., Erickson S.K., Farese R.V. (1998). Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95(22): 13018-13023.

7. Chen H.C., Farese R.V. (2005). Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 25(3): 482-486.

8. Coleman R., Bell R.M. (1976). Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Journal of Biological Chemistry. 251: 4537-4543.

9. Dervishi E., Serrano M., Joy M., Sarto P., Somera A., González-Calvo L., Berzal-Herranz B., Molino F., Martinez-Royo A., Calvo J.H. (2015). Structural characterisation of the acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene and association studies with milk traits in Assaf sheep breed. Small Ruminant Research. 131: 78-84.

10. FAO (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations. https://www.fao.org – pristup 02.09.2020.

11. Graffelman J. (2015). Exploring diallelic genetic markers: The HardyWeinberg package. Journal of Statistical Software. 64(3): 1-23. http://www.jstatsoft.org/v64/i03 - pristup 10.09.2020.

12. Graffelman J., Morales-Camarena J. (2008). Graphical tests for Hardy-Weinberg equilibrium based on the ternary plot. Human Heridity. 65(2): 77-84.

13. HAPIH (2020). Godišnje izvješće za 2019. godinu. Ovčarstvo, kozarstvo i male životinje. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu. https://www.hapih.hr – pristup 02.09.2020.

14. Knapik J., Ropka-Molik K., Pieszka M. (2017). Genetic and nutritional factors determining the production and quality of sheep meat – a review. Annals of Animal Science. 17(1): 23-40.

15. Mahrous K.F.,Hassanane M.S., Abdel Mordy M., Shafey H.I., Rushdi H.E. (2014). Polymorphism of some genes associated with meat-related traits in Egyptian sheep breeds. Iranian Journal of Applied Animal Science. 5(3): 655-663.

16. Meena A.S., Bhatt R.S., Sahoo A., Kumar S. (2016). Genetic polymorphism of the diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene in Malpura sheep. Indian Journal of Small Ruminants. 22(1): 97-99.

17. Mioč B., Pavić V., Barać Z., Vnučec I., Prpić Z., Mulc D., Špehar M. (2011). Program uzgoja ovaca u Republici Hrvatskoj. Hrvatski savez uzgajivača ovaca i koza, Zagreb. https://www.ovce-koze.hr – pristup 03.09.2020.

18. Mioč B., Pavić V., Sušić V. (2007). Ovčarstvo. Zagreb. Hrvatska mljekarska udruga.

19. Mohammadi H., Shahrebabak M.M., Sadeghi M. (2013). Association between single nucleotide polymorphism in the Ovine DGAT1 gene and carcass traits in two Iranian sheep breeds. Animal Biotechnology, 24(3): 159-167.

20. MP (2020). Ministarstvo poljoprivrede. https://www.hpa.mps.hr – pristup 03.09.2020.

21. Nanekarani S., Kolivand M., Goodarzi M. (2016). Polymorphism of a mutation of DGAT1 gene in Lori sheep breed. Journal of Advanced Agricultural Technologies. 3(1): 38-41.

22. Noshahr F.A., Rafat A. (2014). Polymorphism of DGAT1 gene and its relationship with carcass weight and dressing percentage in Moghani sheep breed. Iranian Journal of Aplied Animal Science. 4(2): 331-334.

23. Osorio M.T., Zumalacárregui J.M., Figueira A., Mateo J. (2007). Fatty acid composition in subcutaneous, intermuscular and intramuscular fat deposits of suckling lamb meat: Effect of milk source. Small Ruminant Research. 73: 127-134.

24. Pavić V., Mioč B., Barać Z. (1999). Odlike eksterijera travničke pramenke. Stočarstvo. 53(2): 83-89.

25. R Core Team (2020). A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. www.R-project.org – pristup 10.09.2020.

26. Scatà M.C., Napolitano F., Casu S., Carta A., De Matteis G., Signorelli F., Annicchiarico G., Catillo G., Moioli B. (2009). Ovineacyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1- molecular characterization, polymorphisms and association with milk traits. Animal Genetics. 40(5): 737-742.

27. Sorensen B., Kühn C., Teuscher F., Schneider F., Weselake R., Wegner J. (2006). Diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity in relation to muscle fat content and DGAT1 genotype in two different breeds of Bos Taurus (short communication). Archives Animal Breeding. 49(4): 351-356.

28. Tabaran A., Miahiu M., Dan S.D., Reget O., Pivariu B., Cordis I., Cordea D., Muresan C. (2014). Identification of Polymorphism in Goat and Sheep DGAT1 gene associated with milk production traits. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine. 71(2).

29. Vnučec I., Mioč B., Prpić Z., Pavić V. (2014). Boja i kemijski sastav mesa creske janjadi. 49. Hrvatski i 9. Međunarodni simpozij agronoma. Dubrovnik, Hrvatska: 629-633.

30. Warnes G., Gorjanc G., Leisch F., Man M. (2019). Population genetics. R package version 1.3.8.1.2.. https://CRAN.R-project.org/package=genetics – pristup 10.09.2020.

31. Woods V.B., Fearon A.M. (2009). Dietary sources of unsaturated fatty acids foranimals and their transfer into meat, milk and eggs: A Review. Livestock Science 126: 1-20.

32. Xu Q.L., Chen Y.L., Ma R.X., Xue P. (2008). Polymorphism of DGAT1 associated with intramuscular fat-mediated tenderness in sheep. Journal of the Science of Food and Agriculture. 89(2): 232-237.

33. Yang J.T., Zang R.X., Liu W.J., Xu H.W., Bai J.L., Lu J.X., Wu J.P. (2011). Polymorphism of a mutation of DGAT1 gene in four chinese indigenous sheep breeds. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 6(5): 460-468.

Životopis

Marina Šalković rođena je 10.travnja 1994. godine u Sisku. Cijeli život živi u Kutini koja se nalazi na području Sisačko-Moslavačke županije. Osnovnu školu pohađala je i završila u Kutini. 2009. godine u Kutini upisuje Srednju Školu Tina Ujevića, smjer ekonomist te ju završava 2013. godine. Zbog neuspjelog pokušaja upisa na Učiteljski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, počinje raditi prije ponovnog pokušaja prijave na fakultet. U 2014. godini upisuje preddiplomski studij Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, koji završava 2018. godine, te iste godine upisuje diplomski studij Proizvodnja i prerada mesa. Tijekom studija sama se financirala te je radila nekoliko poslova kroz svih šest godina studiranja. Aktivno se koristi engleskim jezikom u govoru i pismu.