Utjecaj mitogenoma na svojstva mliječnosti goveda

Brajković, Vladimir

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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:204:199203

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

Vladimir Brajković

UTJECAJ MITOGENOMA NA SVOJSTVA MLIJEČNOSTI GOVEDA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Vladimir Brajković

IMPACT OF MITOGENOME ON MILK TRAITS IN CATTLE

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2019

Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Vladimir Brajković

UTJECAJ MITOGENOMA NA SVOJSTVA MLIJEČNOSTI GOVEDA

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof. dr. sc. Ino Čurik
doc. dr. sc. Strahil Ristov

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Vladimir Brajković

IMPACT OF MITOGENOME ON MILK TRAITS IN CATTLE

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors: PhD. Ino Čurik, Full professor
PhD. Strahil Ristov, Assistant professor

Zagreb, 2019

Bibliografski podaci:

- Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
- Znanstveno polje: Poljoprivreda (agronomija)
- Znanstvena grana: Genetika i oplemenjivanje bilja, životinja i mikroorganizama
- Institucija: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za opće stočartsvo
- Voditelj doktorskog rada: prof. dr. sc. Ino Čurik
- Broj stranica: 109
- Broj slika: 18
- Broj tablica: 16
- Broj priloga: 4
- Broj literaturnih referenci: 124

Datum obrane doktorskog rada: 17.05.2019.

Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik

izvanredni profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. Prof. dr. sc. Peter Dovč

redoviti profesor Biotehničkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani

3. Dr. sc. Gregor Gorjanc

znanstveni suradnik Roslin instituta Sveučilišta Edinburgh

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p. 550, 10 000 Zagreb

Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog Fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 05.12.2017, te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 10.07.2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, **Vladimir Brajković,** izjavljujem da sam samostalno izradio doktorski rad pod naslovom:

UTJECAJ MITOGENOMA NA SVOJSTVA MLIJEČNOSTI GOVEDA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovog doktorskog rada;
- da je doktorski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u izradi istoga nisam koristio drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

Zagreb, 17.05.2019.

_____

Potpis doktoranda

Ocjena doktorskog rada

Ovu disertaciju je ocijenilo povjerenstvo u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik (predsjednik)
izvanredni profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. Prof. dr. sc. Peter Dovč
redoviti profesor Biotehničkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani

3. Dr. sc. Gregor Gorjanc
znanstveni suradnik Roslin instituta Sveučilišta Edinburgh

Disertacija je obranjena na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, dana
pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik _____
izvanredni profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. Prof. dr. sc. Peter Dovč, _____
redoviti profesor Biotehničkog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani

3. Dr. sc. Gregor Gorjanc, _____
znanstveni suradnik Roslin instituta Sveučilišta Edinburgh

Mentor: **Prof. dr. sc. Ino Čurik**

Ino Čurik rođen je 25. ožujka 1966. godine u Zagrebu. Oženjen je, otac Tina Josipa i Laure Ine. Diplomirao je 1991. godine na smjeru "Stočarstvo" na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija nagrađen je Rektorovom i Svibanjskom nagradom. Magistrirao je 1995. godine na smjeru "Biomatematika" na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Doktorat znanosti stekao je 2000. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu obranivši disertaciju pod naslovom "Inbreeding u empirijskim i teoretskim populacijama". Kao mentor ili ko-mentor uspješno je vodio osam doktorata. Od 2016. godine je redoviti profesor u trajnom zvanju na Agronomskom fakultetu gdje predaje (voditelj) "Osnove oplemenjivanja domaćih životinja", "Kvantitativnu genetiku" i "Populacijsku genetiku". Autor ili koautor je u više od 80 znanstvenih radova (>56 radova indeksirano je u WOS core collection i citirano 819 puta uz h-indeks = 15) od kojih su mnogi objavljeni u prestižnim časopisima koji proučavaju nasljeđivanje (Nature Genetics, PLoS Genetics, Heredity, Journal of Heredity, Animal Genetics, BMC Genomics, Conservation Genetics, Genetic Selection Evolution, Frontiers in Genetics, Journal of Animal Breeding and Genetics, Journal of Dairy Science, Journal of Animal Science, itd.). Pridruženi je urednik časopisa Frontiers in Genetics, a u uređivačkom odboru je u časopisu Livestock Science (ELISEVIER) i časopisu Animal Genetic Resources (Cambridge press). Od 2007. član je koordinacijskog odbora međunarodnog Internacionalnog simpozija "Animal Science Days". Od 2016. do 2019. voditelj je projekta "Smart Integration of Genetics with Sciences of the Past in Croatia: Minding and Mending the Gap" ("MendTheGap") koji je u pozivu H2020-TWINN-2015 (Twinning: *Spreading excellence and Widening Participation*) bio najbolje rangirani projekt od ukupno 546 prihvaćenih projekata. Dobitnik je "Godišnje državne nagrade za znanost" (Republika Hrvatska) u području biotehničkih znanosti u 2013. godini i "Povelje" za posebne zasluge i doprinos na unapređenju znanstvenog, nastavnog i stručnog rada, te širenju ugleda Fakulteta i agronomske struke kod nas i u svijetu koju mu je dodijelio Agronomski fakultet u Zagrebu 2013. godine. U mladosti je uspješno igrao šah. Tako je 1984. godine bio omladinski viceprvak Hrvatske, 1983. godine bio je viceprvak na International Chess Festival for Juniors (Biel-Bienne, Švicarska), a 1981. godine bio je pionirski prvak Hrvatske.

Mentor: **Doc. dr. sc. Strahil Ristov**

Strahil Ristov rođen je 1959. godine u Zagrebu. Doktorat znanosti stekao je 1997. godine na Fakultetu elektrotehnike i računarstva u Zagrebu u području algoritama na znakovnim nizovima. Od 1990. godine zaposlen je na Institutu Ruđer Bošković, trenutno na radnom mjestu višeg znanstvenog suradnika. Od 2016. godine voditelj je Laboratorija za obradu informacija i signala. Trenutno vodi projekt Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom ″Napredni deterministički i hibridni algoritmi na nizovima, sljedovima i stablima s primjenama u tehničkim znanostima i znanostima o životu″. 2008. godine izabran je za docenta na Fakultetu elektrotehnike i računarstva u Zagrebu gdje na doktorskom studiju vodi predmet ″Algoritmi u bioinformatici″. Bio je član znanstvenog odbora međunarodne konferencije ″Finite State Methods in Natural Language Processing″ i recenzent u brojnim međunarodnim časopisima. Osnovno područje rada S. Ristova su kombinatorni algoritmi na nizovima i teorijsko računarstvo, a od 2013. godine istražuje računarske postupke u populacijskoj genetici. Kao autor ili koautor objavio je 23 znanstvena rada od čega 10 u CC časopisima. Koautor je poglavlja u knjizi ″Mathematics, Computing, Language, and Life″, World Scientific & Imperial College Press.

Zahvala

Želim iskazati veliku zahvalnost mentoru, prof.dr.sc. Ini Čuriku, koji me je svojim savjetima, izvrsnim idejama, stručnim i tehničkim vodstvom usmjeravao tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem komentoru doc.dr.sc. Strahilu Ristovu na savjetima i tehničkom vodstvu kroz računalni dio disertacije.

Zahvaljujem izv.prof.dr.sc. Vlatki Čubrik-Čurik na velikom broju korisnih savjeta i smjernica koje su mi pomogle ne samo u pisanju disertacije već i u provedbi svih laboratorijskih i molekularno-genetičkih analiza. Zahvaljujem joj i na usavršavanjima koja mi je omogućila i podržavala.

Prof.dr.sc. Miroslavu Kapšu dugujem veliku zahvalnost jer bez njegovog vodstva i korisnih rasprava ne bih mogao izgraditi temelj koji je potreban za daljnju nadogradnju i usavršavanje kvantitativnih modela.

Doc.dr.sc. Maji Ferenčaković želim iskazati zahvalnost za trud i pomoć kod prikupljanja uzoraka, provođenju analiza i savjetima vezanim za razne programe.

Zahvaljujem dr.sc. Mariji Špehar na pomoći pri organiziranju skupljanja uzoraka i obradi podataka te ostalim djelatnicima područnih ureda Hrvatske poljoprivredne agencije koji su mi također pomogli u organiziranju sakupljanja uzoraka.

Dr.sc. Dinku Novoselu zahvaljujem na pomoći kod molekularno-genetičkih analiza kao i uveseljavanju radne atmosfere.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Nikoli Ragužu i doc.dr.sc. Borisu Lukiću na velikoj pomoći pri skupljanju uzoraka.

Zahvaljujem kolegicama doc.dr.sc. Dragici Šalamon, Ivani Držaić, mag. ing. agr. i kolegici Mateji Janeš, mag. ing. agr. na konzultacijama prilikom određenih analiza i pozitivnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem farmerima na susretljivosti prilikom skupljanja uzoraka.

Zahvaljujem prijatelju Tomislavu Jakopčinu na edukaciji vezanoj za obradu slika u Adobe Photoshop programu.

Veliko hvala mojim dragim roditeljima, sestri Dorotei i djevojci Dariji na razumijevanju i velikoj podršci tijekom svih izazova doktorskog studija.

Također, zahvaljujem svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ove doktorske disertacije.

Sažetak

Mitohondrijski genom dio je oksidativno fosforilacijskog metaboličkog puta koji je odgovaran za proizvodnju energije u organizmu. Utjecaj nasljeđivanja mitogenoma na proizvodna svojstva u stočarstvu rjeđe je proučavan. Tehnologijom određivanja nukleotidnih sljedova druge generacije, određeni su nukleotidni sljedovi 109 cijelih mitogenoma holstein pasmine goveda, koji predstavljaju 109 različitih rodova. Korištenjem Magellan softvera omogućeno je dodjeljivanje nukleotidnih sljedova mitogenoma 2.373 jedinke i korištenje njihovih proizvodnih svojstava mlijeka (količina mlijeka, količine mliječne masti i količine proteina) za prve tri laktacije. Kvanitativno-genetičkim modelom procijenjen je udio ukupne varijance objašnjen utjecajem citoplazmatskog (mitohondrijskog) nasljeđivanja (m^2). m^2 procijenjen je s četiri različita modela; (i) citoplazmatski model s rodovima (CITO-MODEL); ii) haplotip model mitogenoma (HAPLO-MODEL); (iii) aminokiselinski model s unikatnim aminokiselinskim kombinacijama haplotipova (AMINO-MODEL) i iiii) model evolucijskih haplogrupa (EVOL-MODEL). Utjecaji citoplazmatskog (mitohondrijskog) nasljeđivanja, interakcija stado-godina-sezona teljenja, stalna okolina i izravni aditivni genetski utjecaj uključeni su u model kao slučajni utjecaji. Dob kod prvog teljenja definirana je kao nezavisna kontinuirana varijabla te modelirana kao linearna regresija. Županija je definirana kao fiksni utjecaj. Procijenjeni udjeli fenotipskih varijanca za prve tri laktacije, objašnjene s m^2_{rod}, m^2_{hap} i $m^2_{aminohap}$ iznose od 7% do 10% za svojstvo količine mlijeka. Za svojstvo količine mliječne masti procijenjeni udjeli fenotipskih varijanca za prve tri laktacije, objašnjene s m^2_{rod}, m^2_{hap} i $m^2_{aminohap}$, iznose od 5% do 8%. Najveći procijenjeni udjeli fenotipskih varijanca za prve tri laktacije, objašnjene s m^2_{rod}, m^2_{hap} i $m^2_{aminohap}$, dobiveni su za količinu proteina te iznose od 8% do 15%. Procijenjeni udjeli fenotipskih varijanci u CITO, HAPLO i AMINO modelu značajni su za sva tri mliječna proizvodna svojstva. Utjecaj evolucijskih haplogrupa u procjeni komponenti varijanci proizvodnih svojstava mlijeka nije se pokazao značajnim. Filogenetska analiza mitogenoma holstein goveda otkrila je veliku raznolikost haplotipova unutar T3 haplogrupe koja je specifična za većinu pasmina vrste *Bos taurus* na području Europe. Pripadnost manjeg broja holstein goveda haplogrupama T2 i T5 ukazuje na moguća pretapanja krava autohtonih pasmina s bikovima holstein goveda. Primijenjene analize i dobiveni rezultati pokazali su značajan utjecaj varijabilnosti mitogenoma na fenotipsku varijancu proizvodnih mliječnih svojstava. Doprinos su poznavanju genetske arhitekture svojstava mlijeka i baza su za daljnje poboljšanje procjene uzgojnih vrijednosti goveda. Upotreba nasljeđivanja mitogenoma u praktičnom uzgoju životinja i dalje je izazov.

Ključne riječi: proizvodna svojstva mlijeka, mitogenom, holstein govedo, komponente varijance, određivanje nukleotidnog slijeda druge generacije, filogenetika

Abstract

Mitochondrial genome is a part of the oxidative phosphorylation metabolic pathway and is responsible for the production of energy in an organism. Still, the impact of mitogenome inheritance on the production traits in livestock is rarely studied. Using NGS technology, 109 complete mitogenomes of Holstein cows were sequenced, representing 109 maternal lineages. Magellan software was used to assign mitogenome sequence information to 2.373 cows and to use their milk production records (milk yield, fat yield; and protein yield) for the first three lactation. Quantitative genetic model was used to estimate the proportion of total variance explained by cytoplasmatic (mitochondrial) inheritance (m^2). m^2 was estimated with four different models; i) cytoplasmic model with maternal lineages (CITO-MODEL), ii) haplotypic model with mitogenome haplotypes (HAPLO-MODEL) iii) amino-acid model with unique amino-acid haplotype combinations (AMINO-MODEL) and iiii) model with evolutionary haplogroups (EVOL-MODEL). Cytoplasmatic (mitochondrial) inheritance, interaction herd-year-season, permanent environment and direct additive genetic effect were included in model as random effects. Age at first calving was used as covariate and was modeled as linear regression. Region (county) was included in model as fixed class effect. The estimated proportions of the phenotypic variances for the first three lactations, explained by m^2_{rod}, m^2_{hap} and $m^2_{aminohap}$ were ranging from 7% to 10% for the milk yield. For the fat yield, the estimated proportions of the phenotypic variances for the first three lactations, explained by m^2_{rod} and m^2_{hap}, were ranging from 5% to 8%. The highest proportions of the phenotypic variance for the first three lactations, explained by m^2_{rod}, m^2_{hap} and $m^2_{aminohap}$, were for the protein yield, ranging from 8% to 15%. The estimated proportions of phenotypic variances in the CITO, HAPLO and AMINO models were significant for all three milk production traits. No significant component of variance attributable to the evolution haplogroups was found for the milk production traits. The phylogenetic analysis of Holstein mitogenomes revealed a large variety of haplotypes within the T3 haplogroup that is specific to most Bos taurus breeds in Europe. The presence of a smaller number of Holstein cows within haplogroups T2 and T5 indicates the possibility of crossbreeding between autochthonous cow breeds with Holstein bulls. The performed analyses and the obtained results showed that a considerable proportion of the phenotypic variance in milk traits was explained by the mitogenome variation. This contributes to the knowledge of the genetic architecture of milk production traits that are the basis for a further improvement of breeding values in cattle. The utilization of mitogenome inheritance in practical animal breeding remains challenging.

Keywords: milk production traits, mitogenome, Holstein cattle, variance components, next generation sequencing (NGS), phylogenetics

Popis kratica

Kratica	Značenje
ATP	adenozin trifosfat
bj%	udio bjelančevina
bp	bazni par
c^2	komponenta varijance za utjecaj interakcije stado/godina/sezona
CytB	citokrom b
D petlja	kontrolna regija mitogenoma
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DTT	dithiothreitol
GenBank	baza javno dostupnih nukleotidnih sljedova
h^2	heritabilitet
HVI i HVII	hipervarijabilne regije D petlje mitogenoma
kb	kilo-bazni par
Lak	laktacija
$m^2_{aminohap}$	komponenta varijance za utjecaj aminokileslinskog haplotipa
m^2_{evohap}	komponenta varijance za utjecaj evolucijske haplogrupe
m^2_{hap}	komponenta varijance za utjecaj haplotipa mitogenoma
m^2_{rod}	komponenta varijance za utjecaj roda
Mitogenom	mitohondrijski genom
mm%	udio mliječne masti
mtDNA	mitohondrijska DNA
NGS	određivanje nukleotidnih sljedova druge generacije
OXPHOS	oksidativna fosforilacija
p^2	komponenta varijance za utjecaj stalne okoline
Pi	parsimonijska informativna mjesta
RNA	ribonukleinska kiselina
rRNA	ribosomska ili ribosomalna RNA
S	singleton mjesta
tRNA	transportna RNA
V	varijabilna mjesta

Popis tablica

Tablica 1. Ukupan broj goveda, krava, stada u Republici Hrvatskoj (HPA, 2017). 25
Tablica 2. Brojnost pasmina i udio krava koje su pod kontrolom mliječnosti u Republici Hrvatskoj (HPA, 2017). 26
Tablica 3. Prosječna proizvodnja mlijeka po godini i laktaciji usporedno sa simmental pasminom u Republici Hrvatskoj (HPA, 2017). 26
Tablica 4. Struktura pedigrea s fenotipskim podacima. 39
Tablica 5. Korišteni reagensi i dijelovi PCR reakcije. 44
Tablica 6. Korištene početnice, pozicije umnažanja i veličina umnoženih fragmenata. 45
Tablica 7. Mitogenomi *Bos taurus* vrste korišteni za izradu median-joining mreže. 53
Tablica 8. Deskriptivna statistika ekstrahirane DNA iz različitog materijala 109 uzorkovanih holstein goveda. 58
Tablica 9. Prosječna dubina pokrivenosti nukleotida mitogenoma analiziranih holstein goveda. 60
Tablica 10. Dužina pojedinog dijela mitogenoma, broj varijabilnih mjesta, parsimonijskih informativnih mjesta i singleton mjesta. 62
Tablica 11. Dijelovi mitogenoma korišteni za konstrukciju aminokiselinskih haplotipova. 64
Tablica 12. Deskriptivna statistika za proizvodna svojstva mlijeka. 65
Tablica 13. Deskriptivna statistika za utjecaje u modelu. 66
Tablica 14. Komponente varijance (±SE) za količinu mlijeka (kg). 71
Tablica 15. Komponente varijance (±SE) za količinu mliječne masti (kg). 73
Tablica 16. Komponente varijance (±SE) za količinu proteina (kg). 75
Tablica 17. Lista uzorkovanih jedinki holstein goveda iz Republike Hrvatske i popratne informacije. 99
Tablica 18. Konstruirani haplotipovi cijelih mitogenoma prikazani MJ mrežom. 105
Tablica 19. Popis aminokiselina i njihove kratice. 109

Popis slika

Slika 1. Rasprostranjenost holstein pasmine u svijetu (FAO, 2018). 23
Slika 2. Holstein pasmina. Šampionka Hrvatske 2016. godine (HPA, 2018). 24
Slika 3. Dijelovi mitogenoma – prilagođena slika (Cooper i Hausman, 2004). 28
Slika 4. Cijena i količina određivanja nukleotidnih sljedova od 2000. godine na različitim uređajima (Illumina, 2017). 32
Slika 5. Pregled određivanja nukleotidnog slijeda genoma čovjeka kroz desetljeće. Kapacitet određivanja 3,2 milijardi baznih parova genoma čovjeka eksponencijalno je porastao od 1990. – tih. U 2005. godini, uvođenjem uređaja "Illumina Genome Analyzer System", moguće je bilo odrediti nukleotidni slijed 1,3 genoma. Deset godina kasnije, s uređajem "Illumina HiSeq X Ten", broj genoma kojima je određen nukleotidni slijed je porastao na 18.000 u godinu dana (Illumina, 2017). 33
Slika 6. Pregled određivanje nukleotidnih sljedova druge generacije kroz četiri koraka: (A) priprema bibilioteka, (B) formiranje klastera (C) određivanje nukleotidnih sljedova, (D) analiza nukleotidnih sljedova (Illumina, 2017). 34
Slika 7. Pregled pripremanja multipleks biblioteka. (A) Specifične indeks početnice su dodane tijekom pripremanja biblioteka dva uzorka. (B) Biblioteke su grupirane zajedno. (C) Istovremeno su određeni nukleotidni sljedovi obje biblioteke i eksportirane u jednoj podatkovnoj datoteci (D). Kompjuterskom obradom, demultipleks algoritmima, DNA fragmenti su razdvojeni i soritrani u dvije podatkovne datoteke na osnovu indeksa. (E) Svaki set DNA fragmenata pojedinog uzorka je poravnat na odgovarajući referentni genom (Illumina, 2017). 35
Slika 8. Primjer dubine i duljine pokrivenosti genoma (Scholz, 2018). 36
Slika 9. Princip citoplazmatskog nasljeđivanja (Venema, 2014). 39
Slika 10. Lokacije farmi na kojima su prikupljani uzorci. 40
Slika 11. Uređaj NanoPhotometer P330 Spektrofotometer (IMPLEN, Njemačka) za mjerenje koncentracije DNA (Brajković, 2018). 43
Slika 12. UV transiluminator i uređaj za vodoravnu elektroforezu 43
Slika 13. UV transiluminator i uređaj za snimanje gela UVItech explorer Version 15.01.c (UVItec Ltd., Cambridge, UK) (Brajković, 2018). 43
Slika 14. Mastercycler®nexus gradient (Eppendorf, Njemačka) (Brajković, 2018). 44
Slika 15. HiSeq 1500 uređaj za određivanje slijeda nukleotida druge generacije (CATG, 2014). 47
Slika 16. Protokol za obradu sirovih fastqsanger podataka u cilju dobivanja konsenzus mitonukleotinog slijeda u fasta formatu 50
Slika 17. Primjer vizualizacije dubine i duljine pokrivenosti mitogenoma holstein goveda korištenjem programa IGV - Integrative Genomics Viewer (Robinson i sur., 2011). Kao primjer na slici je vidljivo da je pozicija baznog para 6258 pokrivena s ukupno 7505 očitanih nukleotida. 59
Slika 18. Median-joining mreža filogenetskog odnosa haplotipova pronađenih u holstein goveda u odnosu na haplotipove pronađene u drugim domaćim pasminama goveda. Median-joining mreža je konstruirana na temelju 148 haplotipova koji su dobiveni iz 502 varijabilna mjesta seta cijelog mitogenoma od 167 nukleotidnih sljedova duljine 16.352 bp. Krugovi su proporcionalni frekvenciji haplotipova. Crvena boja označava referentni haplotip za vrstu *Bos taurus (Anderson i sur., 1982)*, žuta označava haplotipove T1 haplogrupe, svijetlo plava haplotipove T2 haplogrupe, svijetlo zelena haplotipove T3 haplogrupe, a roza haplotipove T5 haplogrupe. Haplotipovi holstein goveda iz Kanade označeni su bijelom bojom, iz Kine svijetlo crvenom, iz Hrvatske sivom, iz Južne Koreje tamno plavom i Nizozemske narančastom bojom. Haplotiovi friesian pasmine goveda označeni su tamno zelenom bojom. Okomite crte označavaju broj mutacija između

haplotipova. Detaljne informacije o pripadnosti pojedine jedinke određenom haplotipu se mogu pronaći u prilogu u Tablica 18. 69
Slika 19. Integritet DNA 109 uzoraka holstein goveda iz Republike Hrvatske prikazan na gel elektroforezi. 98

SADRŽAJ

1. UVOD 19
1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja 21
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 22
2.1. Holstein pasmina goveda 22
2.1.1. Povijest pasmine 22
2.1.2. Opis pasmine 23
2.1.3. Holstein govedo u Hrvatskoj 25
2.2. Mitogenom 27
2.3. Utjecaj mitogenoma na prozvodna svojstva mlijeka 29
2.3.1. Citoplazmatsko nasljeđivanje 29
2.3.2. Parcijalni dio mitogenoma 31
2.4. Određivanje nukleotidnih sljedova druge generacije 31
3. MATERIJALI I METODE RADA 37
3.1. Strategija uzorkovanja i korišteni podaci 37
3.1.1. Analiza pedigrea 37
3.1.2. Strategija uzorkovanja - Magellan softvare 37
3.1.3. Prikupljanje uzoraka mlijeka, dlake i tkiva 40
3.2. Molekularno-genetičke analize 41
3.2.1. Ekstrakcija DNA iz mlijeka, dlake i tkiva 41
3.2.2. Provjera kvantitete i kvalitete ekstrahirane DNA 42
3.2.3. Umnažanje mitogenoma PCR-om u 3 koraka 44
3.2.4. Pročišćavanje PCR produkata 45
3.2.5. Priprema biblioteka za određivanje sljedova druge generacije i određivanje slijeda nukleotida 46
3.3. Analiza nukleotidnih sljedova 47
3.3.1. Analiza varijabilnosti mitogenoma 51
3.3.2. Konstrukcija i vrste haplotipova/haplogrupa 51
3.3.3. Filogenetska analiza 52
3.4. Genetičko-statistički modeli 56
3.4.1. Model 56
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA 58
4.1. Kvantiteta i čistoća ekstrahirane DNA 58
4.2. Kvaliteta nukleotidnih sljedova 59
4.3. Genetska varijabilnost mitogenoma 61
4.3.1. Haplotipovi mitogenoma 61

4.3.2. Haplotipovi aminokiselina 63
4.3.3. Evolucijske haplogrupe 64
4.4. Deskriptivna statistika proizvodnih svojstava mlijeka 65
4.5. Filogenetska analiza 66
4.6. Citoplazmatski utjecaj i utjecaj haplotipova mitogenoma 70
4.6.1. Količina mlijeka 70
4.6.2. Količina mliječne masti 72
4.6.3. Količina proteina 74
5. RASPRAVA 76
5.1. Filogenetska analiza 76
5.2. Procjena komponenti varijanci mliječnih svojstava 77
5.3. Magellan 1.0 softver 80
5.4. Pretpostavke i ograničenja istraživanja 80
5.4.1. Interakcija jezgrinog i mitohondrijskog genoma 80
5.4.2. Heteroplazmija 81
5.4.3. Spolni kromosomi 83
5.5. Znanstveni doprinos i daljnji izazov 84
6. ZAKLJUČCI 85
7. POPIS LITERATURE 86
8. ŽIVOTOPIS 96
9. PRILOZI 98
Slika 19. Integritet DNA 109 uzoraka holstein goveda iz Republike Hrvatske prikazan na gel elektroforezi. 98
Tablica 17. Lista uzorkovanih jedinki holstein goveda iz Republike Hrvatske i popratne informacije. 99
Tablica 18. Konstruirani haplotipovi cijelih mitogenoma prikazani MJ mrežom. 105
Tablica 19. Tablica aminokiselina. 109

1. UVOD

Većina ekonomski važnih svojstava u stočarstvu su kvantitativna svojstva. Kvantitativna svojstva su pod utjecajem velikog broja gena pretežno malog utjecaja, ali i utjecaja okoliša što rezultira kontinuiranom promjenom fenotipova (Falconer i sur., 1996). Genetsko poboljšanje kvantitativnih svojstava temelji se na korištenju fenotipskih i pedigre podataka iz kojih se, primjenom mješovitog modela (Henderson, 1984), procjenjuju uzgojne vrijednosti. Rutinska procjena uzgojne vrijednosti u obzir uzima samo učinak jezgrinih gena. Međutim, mitohondrijski genom (mitogenom) se nasljeđuje samo kroz rodove, što osigurava genetski mehanizam citoplazmatskog nasljeđivanja (Legates, 1972; Hutchison i sur., 1974; Giles i sur., 1980; Hohenboken, 1985). Mitogenom može utjecati na ekonomska kvantitativna svojstva i procjenu genetičkih parametara važnih za uzgoj životinja (VanVleck, 2000).

Kod životinja i ljudi, DNA (veličina genoma je približno ~ 3,3 x 10^9 parova baza) je smještena unutar stanične jezgre, dok je samo mali dio (~ 16.569 parova baza) smješten u mitohondrijima. Veličina mitogenoma varira od 15.000 do 17.000 parova baza ovisno o ponavljajućim segmentima DNA kod različitih jedinki i vrsta. Određivanje nukleotidnog slijeda relativno malog udjela mitogenoma, od 200 do 1.000 parova baza, provedeno je u većini prethodnih studija, osobito kada je broj uzoraka bio velik. Najčešće je određivan nukleotidni slijed ne-kodirajućoj i najvarijabilnijoj kontrolnoj regiji (D petlji), a zatim citokromu b (CytB), dok su drugim regijama rjeđe određivani nukleotidni sljedovi.

Tradicionalno se, gotovo sva evolucijska i populacijska istraživanja oslanjaju na pretpostavku da je varijabilnost u mitogenomu selektivno neutralna. Ova bi pretpostavka bila primjenjiva samo ako varijabilnost mitogenoma ne bi imala utjecaja na fenotipsku varijabilnost, što je teško moguće jer mitogenom kodira 13 od ~ 85 komponenata oksidativne fosforilacije (OXPHOS), metaboličkog puta koji je ključan za aerobno disanje (Wallace, 1999).

Posljednjih godina, istraživanja na ljudima su pokazala da mutacije (točkaste mutacije, delecije, varijacije broja kopija, itd.) u mitogenomu dovode do degenerativnih nedostataka (Wallace, 1999; Taylor i Turnbull, 2005) ili utječu na varijabilnost kvantitativnih svojstava kao što su pokretljivost spermatozoida (Ruiz-Pesini i sur., 2000), starenje (Desler i sur., 2011), dijabetes (Poulton i sur., 2002; Liou i sur., 2012), razvoj raka (Shen i sur., 2011), Alzheimerove bolesti (Ridge i sur., 2012) i Parkinsonove bolesti (Ghezzi i sur., 2005). Kod domaćih životinja, krećući s istraživanjem Bell i sur. (1985), utjecaj citoplazmatskog nasljeđivanja najviše je proučavan na proizvodnim svojstvima mlijeka (Kennedy, 1986; Schutz i sur., 1992; Boettcher i Gibson, 1997; Albuquerque i sur., 1998; Roughsedge i sur., 1999) i tova goveda (Woldehawariat i sur., 1977; Northcutt i sur., 1991; Tess i MacNeil,

1994; Mannen i sur., 1998; Mezzadra i sur., 2005; Pun i sur., 2012), bilo procjenom doprinosa roda ukupnoj varijanci kao slučajni učinak ili promatranjem roda kao fiksnog učinka. Boettcher i sur. (1996) generirali su utjecaje rodova iz normalne distribucije i analizirali simulirane podatke s fiksnim i slučajnim modelima te zaključili da se te dvije vrste modela malo razlikuju, ali da slučajni modeli procjenjuju učinke roda preciznije. U navedenim studijama, citoplazmatski učinci analizirali su se pod pretpostavkom da rodovi dobiveni iz pedigrea odražavaju polimorfizam mitogenoma te su varirali od zanemarivog učinka do 10% fenotipske varijabilnosti. Modeli s citoplazmatskim učinkom također su vrednovani u peradi (Szwaczkowski i sur., 1999), ovaca (Hanford i sur., 2003; Snowder i sur., 2004) i svinja (Fernández i sur., 2008). U manjem broju studija, rodovi su analizirani polimorfizmima određenim molekularno-genetičkim analizama, ali ne cijelog mitogenoma, već manjih dijelova (Brown i sur., 1989; Schutz i sur., 1994; Boettcher i sur., 1996a; Qin i sur., 2012).

U ovoj disertaciji koristit će se polimorfizmi cijelog mitogenoma određeni molekularno-genetičkim analizama. Provjerom podudaranja polimorfizama mitogenoma u obliku haplotipa s određenim rodom u pedigreu, ukazat će se na točnost vođenja pedigrea. Kako se radi o citoplazmatskom nasljeđivanju, nedosljednost haplotipa u rodu, osim pogreške u vođenju pedigrea, može se očitovati i kao pojava rijetkih mutacija unutar roda.

Nedavni tehnološki razvoj i pojava određivanja sljedova druge generacije (engl. Next Generation Sequencing, NGS) znatno su smanjili troškove i brzinu određivanja nukleotidnih sljedova čak i kod velikih istraživanja (Van Tassell i sur., 2008; Out i sur., 2009; Bansal i sur., 2010). Ovaj tehnološki napredak omogućio je prvi uvid u razumijevanje genetske podloge fenotipske varijabilnosti (visina, indeks tjelesne mase, krvni tlak, predispozicija za bolesti, genetski defekti, rast, proizvodnja mlijeka itd.). Primjena ovog znanja od posebne je važnosti za razvoj humane i veterinarske medicine, farmaceutsku industriju i poljoprivredu. To je razlog brzog rasta istraživanja koja proučavaju utjecaj genoma na fenotipsku varijabilnost, ali uglavnom jezgrinog genoma. S druge strane, potencijalni učinak mitohondrijskog genoma nije dovoljno istražen i postoji samo nekoliko pionirskih istraživanja koja su istraživala mitogenom kod ljudi i miševa kao životinjskog modela. Istodobno, malo se zna o utjecaju cijelog mitohondrijskog genoma na fenotipsku varijabilnost proizvodnih svojstava u komercijalnim populacijama domaćih životinja. Većina istraživanja vezanih uz varijabilnost mitogenoma (Edwards i sur., 2010; Duchêne i sur., 2011; Lippold i sur., 2011; Jacobsen i sur., 2012) uglavnom se usredotočuju na proučavanje filogenetike.

Važnost utjecaja mitohondrijskog genoma na ekonomski važne osobine goveda nikada nije bila proučavana u mliječnim populacijama holstein goveda u Hrvatskoj. Stoga je cilj ove studije procijeniti proporciju fenotipske varijance mliječnih svojstava (količine mlijeka, mliječne masti i proteina), koja je pod utjecajem polimorfizama mitogenoma.

1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Hipoteza:

1. Polimorfizam mitogenoma utječe na varijabilnost količine mlijeka, mliječne masti i mliječnih proteina.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Tipizirati mitogenom goveda holstein pasmine i odrediti broj haplotipova.
2. Procijeniti utjecaj polimorfizama mitogenoma.
3. Procijeniti dio fenotipske varijance mliječnih svojstava (količine mlijeka, mliječne masti i proteina), koji je pod utjecajem polimorfizama mitogenoma.

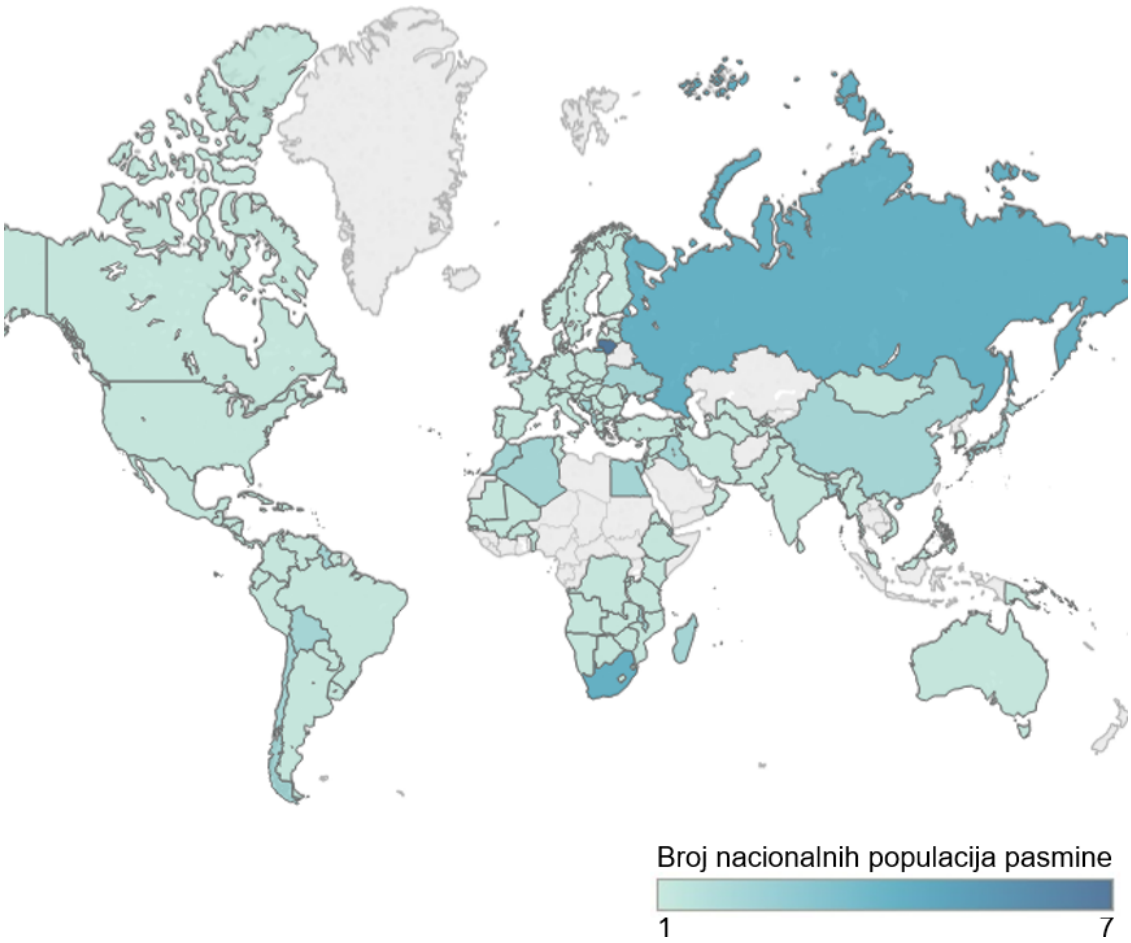
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Holstein pasmina goveda

2.1.1. Povijest pasmine

Holstein-friesian pasmina goveda, ili holstein kako se obično zove, predstavlja najmlječniju, ali i najrasprostranjeniju pasminu goveda (133 zemlje; FAO 2018) (Slika 1). Nastala je u Sjedinjenim Američkim Državama na temeljima holand-fresian pasmine goveda koja potječe iz dvije najsjevernije pokrajine Nizozemske, Sjeverne Holandije i Zapadne Frizije. Prvu čistokrvnu pasminu holstein goveda stvorio je Winthrop Chenery (Belmont, Massachusetts). Uzgoj je započeo 1852. godine kada je kupio crno-bijelu holand-firesian kravu s nizozemskog broda, koja je opskrbljivala mornare svježim mlijekom za vrijeme plovidbe od Europe do američkog kontinenta (Mitić i sur., 1987). Winthrop Chenery je 1864. godine napisao članak o svom stadu holstein goveda gdje je prvi put upotrijebio ime „holstein“, koje je do tada zvao „Dutch“ (holandska pasmina). Članak je objavljen u godišnjem izvještaju (U.S.D.A. Report, 1864., p. 161). Glavna razlika između holsteina i holand-friesian pasmine je u tome što je američki holstein izrazito mliječno govedo, a holand-friesian pasmina kombiniranog tipa s naglašenom mliječnom proizvodnjom. Do 1900. godine selekcijski rad kod holand-friesian pasmine bio je koncentriran na proizvodnju mlijeka i sadržaj mliječne masti, međutim polovicom 19. stoljeća križana je sa shorthorn pasminom u svrhu popravljanja konformacije trupa i boljih tovnih osobina, kada se pažnja počinje obraćati više na mesnatost. Tako je prije 60-70 godina stvoren tip holandsko-frizijskog goveda kombiniranog tipa, tj. za mlijeko i meso.

Prva organizacija holstein pasmine u svijetu osnovana je 1871. godine u Sjedinjenim Američkim Državama kao Asocijacija uzgajivača thoroughbred holstein goveda, a prva matična knjiga objavljenja je 1872. godine. Zanimljivo je za spomenuti da se holstein pasmina iz SAD-a posljednjih desetljeća intenzivno koristi za unaprjeđenje govedarstva mnogih europskih, ali i zemalja izvan Europe. Ova praksa poznata je pod imenom „holstenizacija“.



Slika 1. Rasprostranjenost holstein pasmine u svijetu (FAO, 2018).

2.1.2. Opis pasmine

Holstein pasmina je crno-bijele boje sa šarama različitog oblika i veličine, ali jasnog razdvajanja (Slika 2). Boja je karakteristika standarda pasmine pa se nastoji da raspodjela bijele i crne boje iznosi po 50%, ali postoje i grla kod kojih prevladava samo jedna od tih dviju boja.

Glava je suha i laka s krupnim očima te malih rogova oblika vijenca koji se nalaze iznad čeone kosti. Čelo i dio lica su gotovo iste širine tako da glava gledana sprijeda ima pravilni uglasti oblik. Profil glave je ravan, a samo izuzetno može biti ulegnut. Uši su tanke i po rubu s unutarnje strane obrasle tankim, kratkim i sjajnim dlakama, što ukazuje na finu konstituciju životinje. Vrat je dug, relativno uzak s velikim brojem kožnih nabora, koji počinju od donje vilice. Ova karakteristika mliječne pasmine goveda morfološki ukazuje na povećanu mliječnost goveda.

Najkrupnija je od mliječnih pasmina goveda. Krave su u grebenu prosječno visoke 145 cm, a bikovi 152 cm. Krave su čvrste konstitucije te imaju dobro razvijenu dubinu grudi, zaobljenja rebra, dugačke i široke sapi koji omogućuju odličnu podlogu dobro razvijenom

vimenu. Vime se s prednje strane pruža potrbušno sve do mliječne jame, a sa zadnje strane prema mliječnom ogledalu. Mliječno ogledalo, mliječne vene i mliječna jama kao znakovi mliječnosti su naglašeni. Zadnje četvrtine vimena su dublje od prednjih, a sise su velike i razvijene. Zbog razvijenih sapi pojavljuju se gladne jame. Korijen repa je relativno tanak i završava s dugim pramenom dlaka. Prednji i zadnji ekstremiteti sastavljeni su iz dugačkih i tankih kostiju, tako da izgledaju suhi, a završavaju pigmentiranim papcima. Koža je tanka jer nije razvijena prava koža (lat. *cutis*) niti potkožje (lat. *subcutis*), tako da se lako odvaja od rebara i moguće je veće nabiranje, što npr. nije slučaj kod tovnih pasmina goveda. Muskulatura je nedovoljno razvijena zbog jednostrane selekcije na povećanje mliječnosti, a mišići su suhi jer nedostaje intermuskularno i intramuskularno masno tkivo zbog toga što se najveći udio unesene hrana pretvara u mlijeko. Prosječna masa tijela krave, koja je završila rast, iznosi od 650 do 680 kg, a bikova 1.000 kg.

U rasplodu se krave prosječno koriste 6 do 7 godina, kada ostvare četiri teljenja i četiri laktacije. Potpunu zrelost i proizvodnju postižu s 5-6 godina starosti. Prosječni genetski kapacitet mliječnosti ove pasmine iznosi više od 10.000 kg što je povezano s primjenom menadžmenta i hranidbe.



Slika 2. Holstein pasmina. Šampionka Hrvatske 2016. godine (HPA, 2018).

2.1.3. Holstein govedo u Hrvatskoj

Prema godišnjem izvješću Hrvatske poljoprivredne agencije o uzgoju goveda za 2017. godinu, od ukupno 466.215 goveda Hrvatskoj, 143.221 krava pripada mliječnim i kombiniranim pasminama (Tablica 1), pri čemu su tradicionalno najbrojnije simmental (62,33%) i holstein pasmina (23,90%) (Tablica 2). Približno 90% krava holstein pasmine je uključeno u sustav kontrole mliječnosti (Tablica 2). Najveći broj goveda, ali i krava uzgaja se u Osječko-baranjskoj, Bjelovarsko-bilogorskoj i Koprivničko-križevačkoj županiji. Ove tri županije drže skoro 50% goveda i 43% krava te su prema tome i vodeće županije u proizvodnji mlijeka i mesa. Holstein goveda su uglavnom zastupljena na srednjim i većim obiteljskim gospodarstvima, te velikim specijaliziranim farmama. Na obiteljskim gospodarstvima se uglavnom drže u mješovitim stadima (npr. skupa sa simmentalskim kravama), dok se na velikim specijaliziranim farmama (100 – 2.500 krava) uzgajaju u čistim stadima.

Hrvatska poljoprivredna agencija provodi kontrolu mliječnosti sukladno preporukama Međunarodne organizacije za kontrolu proizvodnosti domaćih životinja - ICAR (The International Committee for Animal Recording). Mjerenje i uzorkovanje mlijeka obavlja se odobrenim mjernim uređajima, a prikupljanje podataka putem ručnih računala (dlanovnik). Prosječna proizvodnja mlijeka 26.069 holstein krava po laktaciji (305 dana) u 2017. je iznosila 7.889 kg uz prosjek od 4,0% mliječne masti (mm) i 3,3% proteina (Tablica 3). Također, u istoj Tablici 3, vidljiv je prosjek mlijeka posebno za prve tri laktacije kao i vrijednosti laktacije za simmental pasminu goveda radi usporedbe.

Pored visoke mliječnosti, glavni uzgojni ciljevi uključuju zdravlje, dugovječnost, plodnost i funkcionalnu vanjštinu. Uzgojni program je u značajnoj mjeri povezan sa uzgojnim programima drugih populacija (npr. Njemačka) (HPA, 2018).

Tablica 1. Ukupan broj goveda, krava, stada u Republici Hrvatskoj (HPA, 2017).

Godina	**Goveda**		**Sve krave**		**Mlije. i komb.***	**Kontrola mliječnosti**	
	Grla	**Stada**	**Grla**	**Stada**	**Grla**	**Grla**	**Stada**
2013.	470.329	36.878	180.946	30.710	167.491	101.637	6.126
2014.	462.568	35.631	178.827	29.277	164.347	100.871	5.767
2015.	472.299	34.347	174.805	27.745	159.268	98.567	5.480
2016.	462.361	33.079	167.628	26.297	151.274	93.080	4.950
2017.	**466.215**	**31.576**	**160.560**	**24.434**	**143.221**	**87.825**	**4.636**

* krave mliječnih i kombiniranih pasmina

Tablica 2. Brojnost pasmina i udio krava koje su pod kontrolom mliječnosti u Republici Hrvatskoj (HPA, 2017).

Pasmina	**Brojnost**	**Kontrola mliječnosti**		**Ostale**		**Ukupni udio (%)**
	N	**N**	**Udio (%)**	**N**	**Udio (%)**	
Simmental	100.078	50.511	50,5	49.567	49,5	62,33
Holstein	**38.379**	**34.754**	**90,6**	**3.625**	**9,4**	**23,90**
Smeđa	4.359	1.813	41,6	2.546	58,4	2,71
Crveno švedsko	68	67	98,5	1	1,5	0,04
Siva	169	30	17,8	139	82,2	0,11
Jersey	159	155	97,5	4	2,5	0,10
Normande	9	9	100,0			0,01
Charolais	1.380			1.380	100,0	0,86
Hereford	1.113			1.113	100,0	0,69
Angus	1.942			1.942	100,0	1,21
Limousin	484			484	100,0	0,30
Škotsko visinsko	66			66	100,0	0,04
Blonde d'Aquitaine	50			50	100,0	0,03
Salers	423			423	100,0	0,26
Aubrac	194			194	100,0	0,12
Dexter	12			12	100,0	0,01
Mađarska siva	45			45	100,0	0,03
Sayaguesa	9			9	100,0	0,01
Buša	1.060			1.060	100,0	0,66
Istarsko govedo	860			860	100,0	0,54
Slavonsko srijemski podolac	201			201	100,0	0,13
Križanci	9.500	486	5,1	9.014	94,9	5,92
Ukupno	**160.560**	**87.825**	**54,7**	**72.735**	**45,3**	**100,0**

Tablica 3. Prosječna proizvodnja mlijeka po godini i laktaciji usporedno sa simmental pasminom u Republici Hrvatskoj (HPA, 2017).

Godina	**Standardna laktacija - 305 dana**				**Cijela laktacija**			
	N	mlijeko (kg)	M (%)	P(%)	Mlijeko (kg)	M (%)	P (%)	dani
				simmental				
2016.	39.735	4.971	4,0	3,3	5.791	4,1	3,4	355
2017.	38.570	5.080	4,1	3,3	5.978	4,1	3,4	361
				holstein				
2016.	29.032	7.633	4,0	3,3	9.102	4,0	3,4	381
2017.	26.069	7.889	4,0	3,3	9.404	4,1	3,4	382
Lakt.								
				simmental				
1	8.758	4.976	4,1	3,3	6.050	4,1	3,4	374
2	7.899	5.232	4,1	3,4	6.146	4,1	3,4	360
3	6.599	5.271	4,1	3,4	6.161	4,1	3,4	360
≥4	15.314	4.980	4,0	3,3	5.772	4,1	3,4	354
				holstein				
1	9.285	7.512	4,0	3,3	9.270	4,0	3,4	390
2	6.718	8.365	4,0	3,4	9.799	4,1	3,4	378
3	4.728	8.435	4,1	3,3	9.783	4,1	3,4	374
≥4	5.338	7.463	4,0	3,3	8.807	4,1	3,4	380

*M – mliječna mast, P – proteini

2.2. Mitogenom

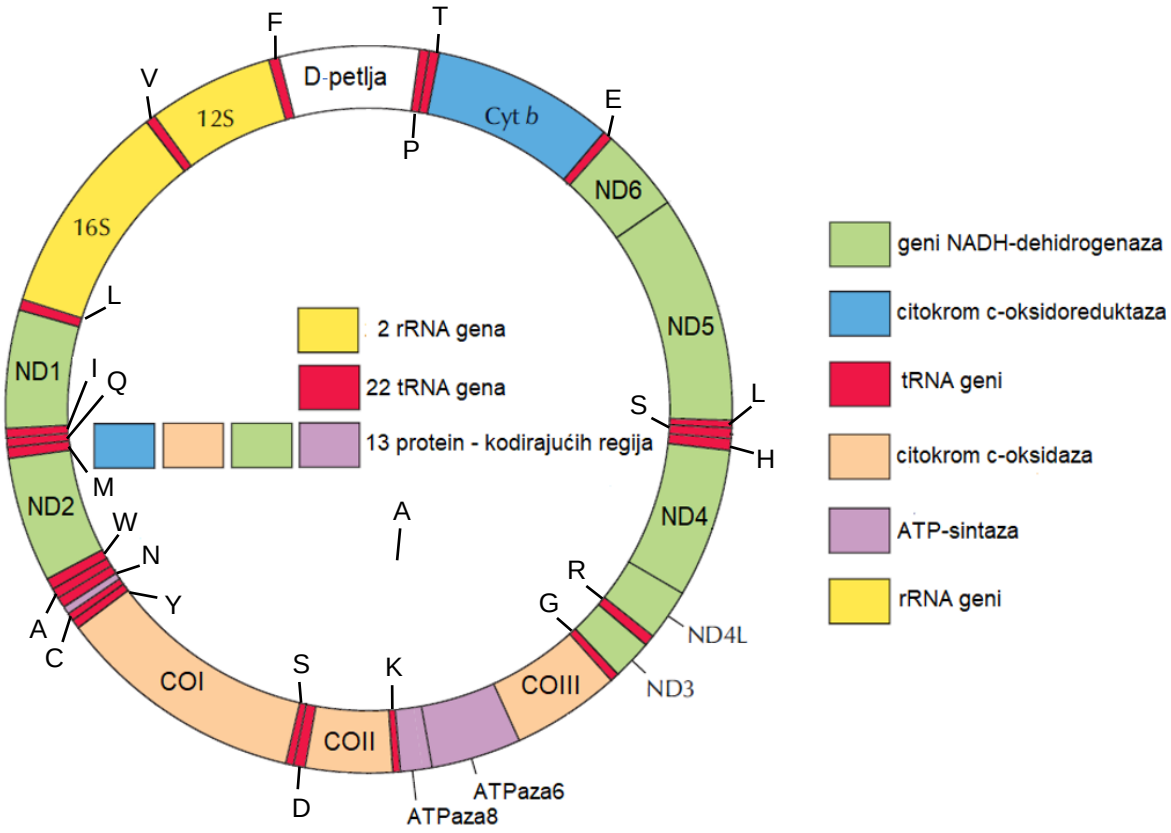
Mitohondriji kao citoplazmatski organeli, imaju ključnu ulogu u proizvodnji metaboličke energije u eukariotskoj stanici (Whittaker i Danks, 1978). Odgovorni su za stvaranje najvećeg dijela uporabljive energije oslobođene razgradnjom ugljikohidrata i masnih kiselina koja se procesom oksidativne fosforilacije pretvara u adenozin trifosfat (ATP), glavno unutarstanično skladište energije. Mitohondriji su jedinstveni među citoplazmatskim organelima jer sadrže vlastitu DNA koja kodira ribosomske RNA (rRNA), transportne RNA (tRNA) i protein kodirajuće regije. Mitohondriji su stoga izgrađeni dijelom od proteina kodiranih vlastitim genomom, ali i dijelom od proteina kodiranih genomom jezgre i unesenih iz citosola.

Dugi niz godina se smatralo da su se mitohondriji razvili od bakterija koje su uspostavile simbiotski odnos unutar eukariotskih stanica u kojima žive. Ova hipoteza je potkrijepljena rezultatima slijeda nukleotida u DNA koja je pokazala veliku sličnost između genoma mitohondrija i bakterije *Rikettsia prowazekii*. Baketrije roda *Rikettsia* su unutarstanični paraziti koji se, kao i mitohondrij, razmnožavaju samo u eukariotskoj stanici. Zbog njihovog sličnog načina života, slijed DNA bakterija roda *Rikettsia* i mitohondrija upućuju da imaju zajedničkog pretka od kojeg se razvio mitogenom današnjih bakterija (Cooper i Hausman, 2004).

Svaki mitohondrij sadrži dvije do deset kopija mitohondrijske DNA (mtDNA). Za razliku od jezgrine DNA koja je dvolančana zavojnica, mtDNA je kružna, dvolančana DNA molekula. Postoje četiri specifične karakteristike mitohondrijskog genoma: (1) citoplazmatsko nasljeđivanje; (2) visoka stopa mutacije (od 100 do 1.000 puta veća u usporedbi s jezgrinim genomom); (3) nedostatak rekombinacije; i (4) smanjena efektivna veličina populacije. Kako su mitohondriji mnogobrojni u velikom broju životinjskih tkiva, količina mtDNA je prikladna za ekstrakciju DNA i amplifikaciju čak i u razgrađenim materijalima kao što su drevne kosti i zubi. Zato je u posljednja tri desetljeća, mtDNA široko korištena kao važan izvor informacija za proučavanje evolucijskog odnosa među vrstama ili populacijama (Moritz i sur., 1987).

Anderson i sur. (1982) su prvi odredili nukleotidni slijed cijelog mitogenoma goveda (vrsta: *Bos taurus)* čija dužina iznosi 16.338 parova baza (bp). Navedeni mitogenom je pohranjen u online dostupnoj banci gena - NCBI (engl. GenBank) (Clark i sur., 2015) pod pristupnim brojem V00654 te se koristi kao referentni mitogenom. Mitogenom goveda kodira 37 gena od čega 2 rRNA (12S i 16S), 22 tRNA (obilježene jednoslovnom oznakom aminokiseline) (Tablica 19) i 13 protein kodirajući regija (proteini koji ulaze u strukturu respiratornih kompleksa) (Slika 3). Područje mitogenoma označeno “D petlja“, predstavlja nekodirajuću regiju koja sadržava ishodište replikacije i promotore transkripcije. Mjesto je

interakcije jezgrino kodirane transkripcije i replikacijskih faktora koji prelaze u mitohondrij da bi inicirali transkripciju, a zatim i replikaciju mitogenoma. D petlja sadrži dvije hipervarijabilne regije (HVI i HVII), koje molekularni genetičari često koriste u filogenetici za identifikaciju predaka s majčine strane (roda) i migracije (Ruiz-Pesini i sur., 2004). S razvojem tehnologije određivanja nukleotidnih sljedova, a i pristupačnije cijene, u spomenutim studijama prelazi se na analize cijelog mitogenoma pa i genoma.



Slika 3. Dijelovi mitogenoma – prilagođena slika (Cooper i Hausman, 2004).

Tijekom vremena, razvoj različitih rodova je popraćen prilagodbom mitogenoma na promjene u okolišu (Ruiz-Pesini i sur., 2004). Kao posljedica, mutacije su se fiksirale i nastali su različiti rodovi iz jednog ili više zajedničkih predaka. Kombinacije polimorfizama mitogenoma koje karakteriziraju svaki rod, očituju se grupiranjem u skupine poznate kao haplogrupe i manje podjedinice haplotipove (minijaturne genotipove) (Wallace i sur., 2003). Kao takvi, haplotipovi mitogenoma su pogodni za filogenetske analize, razlikovanje pasmina, i u ovoj studiji za procjenu fenotipske varijance mliječnih svojstava.

2.3. Utjecaj mitogenoma na prozvodna svojstva mlijeka

U dosadašnjim studijama, citoplazmatski učinci mitogenoma su se analizirali pod pretpostavkom da su rodovi dobiveni iz pedigrea odraz polimorfizama mitogenoma ili u manjem broju istraživanja, da su rodovi dobiveni i stvarnim polimorfizmom, ali samo jednog dijela mitogenoma, ne i cijelog. U spomenutim analizama, koristio se animal model kojim je procijenjen utjecaj roda na fenotipsku varijancu mliječnih svojstava kao slučajni učinak ili promatranjem roda kao fiksnog učinka. Proizvodna mliječna svojstva su se proučavala po laktaciji trajanja 305 dana.

2.3.1. Citoplazmatsko nasljeđivanje

Bell i sur. (1985) su za potrebe ispitivanja citoplazmatskog nasljeđivanja na proizvodna svojstva mlijeka koristili 102 roda prateći pedigre 4.461 jedinki holstein pasmine goveda. Utjecaj roda na količinu mlijeka, količinu mliječne masti i postotak mliječne masti je iznosio 2,0%, 1,8% i 3,5% fenotipske varijabilnosti u prvoj laktaciji. Također, korištenje modela gdje se utjecaj roda promatrao kao fiksni utjecaj, pokazao se značajnim za spomenuta svojstva. Huizinga i sur. (1986) su koristili slične modele na mliječnim proizvodnim podacima prve laktacije, 290 junica holstein-friesian i holand-friesian pasmine, za koje su pretpostavili da svaka od njih predstavlja jedan rod, s obzirom da su uzete iz različitog stada. Doprinos roda na fenotipsku varijabilnost količine mlijeka, postotka mliječne masti, postotka proteina i zajedno količine masti i proteina je iznosio 5,6%, 4,8%, 6,2% i 10,1%.

U studiji Kennedy (1986), računalne simulacije su korištene za generiranje mliječnih proizvodnih podataka sličnih karakteristika kao i kod Bell i sur. (1985), kako bi se provjerio utjecaj citoplazmatskog nasljeđivanja, ali koristeći aditivne genetske učinke koji nisu bili uzeti u obzir. Utjecaj roda na fenotipsku varijabilnost je bio 3,2% za postotak mliječne masti, a 1,4% za količinu mlijeka, što se može pripisati utjecaju mitohondrija u sintezi masnih kiselina. Kako postotak mliječne masti ima veći heritabilitet (0,6) nego količina mlijeka (0,3), kao rezultat, zanemaren aditivni genetski učinak ima veći učinak na fenotipsku varijancu postotka mliječne masti kod citoplazmatskog nasljeđivanja. Iz toga se zaključuje da izostavljanje aditivnih genetskih učinaka može proizvesti lažne citoplazmtske učinke te je sugerirao da animal model može razdvojiti citoplazmatski učinak od aditivnog genetskog učinka. Također, Achilli i sur. (2008) su pokazali da se varijanca može razdvojiti na aditivne direktne učinke, majčinske genetske utjecaje i citoplazmatske učinke.

Schutz i sur. (1992) su koristeći 53 roda 105 jedinki holstein goveda, procijenili utjecaj roda na količinu mlijeka, količinu mliječne masti i postotak mliječne masti kao 5,2%, 4,1% i 10,5% fenotipske varijabilnosti. Osim kao slučajni utjecaj u procjeni komponenti

varijanci, rodovi su bili uključeni u animal model i kao fiksni učinak te su značajno utjecali na količinu masti, ali ne i na količinu mlijeka. Također, Schutz i sur. (1992) su otkrili kako je aditivna varijabilnost majke jezgrinog podrijetla zanemariva za količinu mlijeka ili masti. Prije toga, nije bilo jasno utječe li aditivna varijabilnost majke na količinu proizvodnih svojstava mliječnih goveda. Razlog je bio što telad obično ne siše majke pa bi zbog toga aditivna varijabilnost roda bila uzrokovana samo unutarmaternicnom okolinom. S druge strane, aditivni genetski utjecaj majke je prisutan kod tovnih pasmina goveda jer držanje teladi s majkom utječe na rast teladi prije odbića (Woldehawariat i sur., 1977).

Koristeći Gibsonov algoritam za simulacije i Bayesian statistiku za procjenu varijance učinka rodova, Boettcher i Gibson (1997) su na temelju 245.510 fenotipskih zapisa prve laktacije holstein goveda procijenili utjecaj roda na količinu mlijeka, mliječne masti, proteina i postotak mliječne masti i proteina manjim od 0,5% fenotipske varijance. Prema ovim rezultatima, vidljivo je da utjecaj roda na postotak mliječne masti nije veći nego na količinu mlijeka što je kontrastu s prijašnjim studijama (Bell i sur., 1985; Schutz i sur., 1992). Također, procjene hertabiliteta za količinu proizvodnih mliječnih svojstava su se kretale između 0,25 i 0,35, a za postotak proizvodnih mliječnih svojstava od 0,50 do 0,60.

Prosjek procijenjenog utjecaja roda na količinu mlijeka, količinu mliječne masti i postotak mliječne masti u prve tri laktacije 68 063 holstein jedinke, koja obuhvaća 138.869 fenotipskih podataka (prosjek uzoraka testiranih modela je bio 4.926 jedinke i 2.026 rodova) na fenotipsku varijancu je iznosio 0,011, 0,008 i 0,009 (Albuquerque i sur., 1998). Također, uključivanje ili ne dodavanje aditivnih genetskih učinaka majki i kovarijance između majčinskih i direktnih učinaka u model, nije promijenilo doprinos utjecaja roda na fenotipsku varijancu.

Roughsedge i sur. (1999) su koristeći 1.118 fenotipskih zapisa, 517 krava i 56 rodova, procjenjivali utjecaj roda na količinu mlijeka, mliječne masti i proteina u prvih 26 tjedana laktacije. Jedino je pronađen utjecaj roda na količinu mliječne masti koji je iznosio 4% fenotipske varijance.

Prvu analizu utjecaja roda na količinu mlijeka, mliječne masti, proteina i postotak mliječne masti i proteina, na holstein govedima u Hrvatskoj, je provela Spehar i sur. (2017). Proizvodni podaci su obuhvaćali 102.961 fenotipskih zapisa, 46.696 jedinki i 8.583 rodova. Doprinos roda fenotipskoj varijanci je iznosio 2% za postotak mliječne masti i proteina te 3% za količinu mlijeka, mliječne masti i proteina.

2.3.2. Parcijalni dio mitogenoma

Brown i sur. (1989) su razlikovanjem 16 od 35 rodova holstein pasmine goveda, na temelju barem jednog restrikcijskog mjesta na 4,3 kilobaze (kb) dugom odsječku mtDNA (obuhvaćao 52-bp tRNA-Pro, 910 bp D petlje, 66bp tRNA-Phe, 954 bp rRNA, 66 bp tRNA-Val, 1570 bp 16S RNA, 74 bp tRNA-Leu i 592 bp ND1), ukazali da za potrebe razdvajanja rodova i proučavanje citoplazmatskog utjecaja, nije dovoljan pedigre, već su potrebne i molekularne analize.

Schutz i sur. (1994) su u svom istraživanju koristili 36 rodova holstein pasmine goveda (728 jedinki i 1.800 fenotipskih zapisa), koji su prema supstituciji baznog para (bp) 169 (adenin u gvanin), D petlje mitogenoma, razdvojeni na dvije grupe. Supstitucija 169. baznog para, korištena kao fiksni efekt u modelu, pokazala je značajni utjecaj na količinu i postotak mliječne masti. Također, ostalih 16 polimorfizama regije D-petlje, koji su podijelili 36 rodova u 24 grupe, pokazali su značajan utjecaj na postotak mliječne masti. Lindberg (1989) je otkrio da je polimorfizam 169-og bp regije D-petlje od evolucijske važnosti zbog filogenetskog grananja. Tako različiti rodovi su se mogli razviti dok su bili geografski razdvojeni ili zbog selekcije.

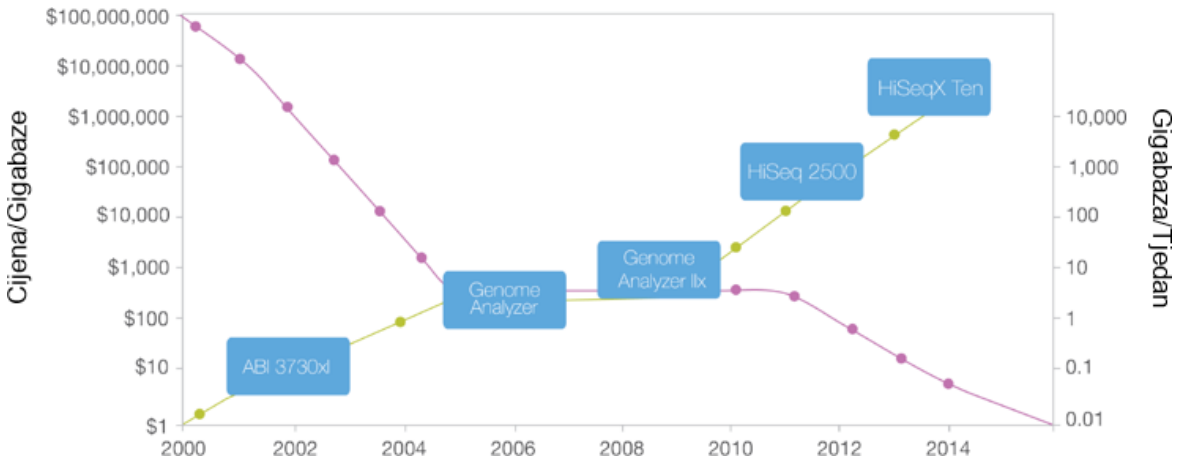
U svrhu provjere korelacije između 11 polimorfizama mtDNA u regijama koji kodiraju rRNA i proizvodnih svojstava mlijeka, Boettcher i sur. (1996a) su koristili 1476 fenotipska zapisa 602 holstein goveda, pokrivajući 29 rodova prateći pedigre. Utjecaj polimorfizama se pokazao značajnim za količinu mlijeka, količinu masti te postotak masti. Također, istražili su utjecaj 4 polimorfizma regije D-petlje mtDNA, koristeći 1472 fenotipska podatka, 668 holstein goveda pokrivajući 12 rodova. Nije pronađena značajna veza između polimorfizama i spomenutih proizvodnih svojstava kao kod polimorfizama rRNA regije.

Povezanost polimorfizama jednog nukleotida mtDNA gena ATPaze 6 i ATPaze 8, koji bi rezultirali različitim stupnjem energije metabolizma, s proizvodnim mliječnim svojstvima je istražena od strane Qin i sur. (2012). U svrhu istraživanja, određen je nukleotidni slijed gena ATPaze 6 i ATPaze 8 od 842 bp, 303 holstain krave. Na temelju 18 polimorfnih mjesta, izračunato je 6 haplotipova. Analize su pokazale jedino značajnu povezanost između haplotipova i količine mlijeka.

2.4. Određivanje nukleotidnih sljedova druge generacije

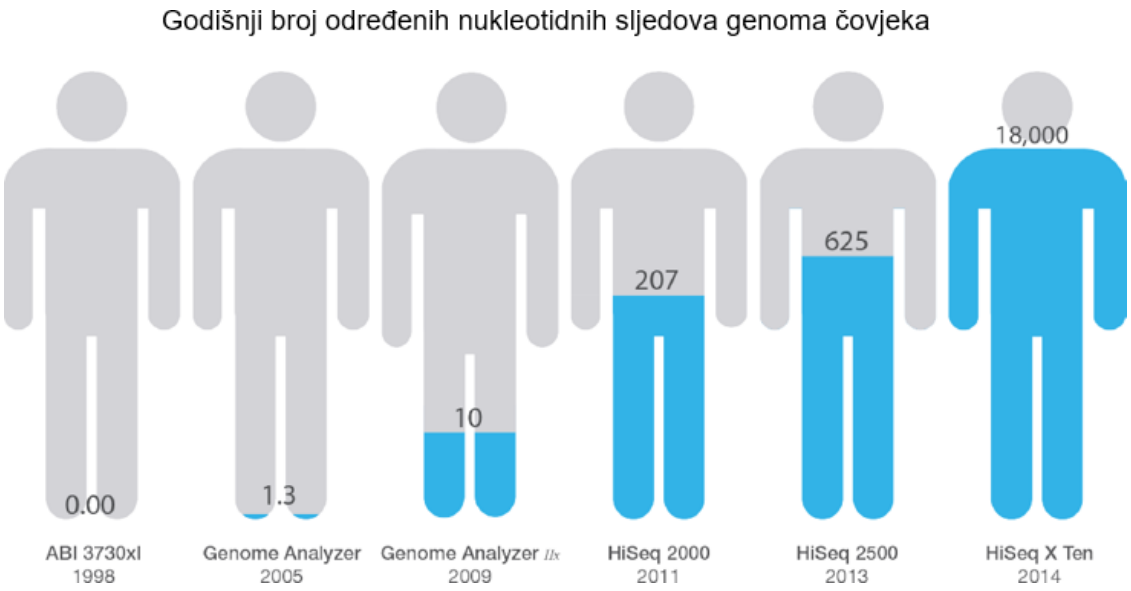
Projekt humanog genoma (engl. The Humane Genome Project, 1990. – 2003.), kao internacionalni program, u trajanju od 13 godina i 3 milijuna dolara investicija, je omogućio određivanje nuklotidnog slijeda genoma čovjeka, ali i napredak u samoj tehnologiji. Nukleotidni slijed ljudskog genoma je određen tehnikom dodavanja dideoksinukleotida koju je prvi opisao Fred Sanger 1977. godine. Kako je ova tehnika bila spora i skupa, a njena

automatizacija kroz trajanje projekta nedovoljna, početkom 2005. godine krenula je primjena novih metoda određivanja nuklotidnih sljedova, nazvane određivanje nukleotidnih sljedova druge generacije (engl. next generation sequencing – NGS). Nove tehnologije se temelje na tehnici određivanja nukleotidnih sljedova sintezom (engl. sequencing by synthesis), koju su začeli Shankar Balasubramanian i David Klenerman na Sveučilištu Cambridge 1998. godine. Od 2005. godine, upravo kao posljedica razvoja nove tehnologije, troškovi određivanja nukleotidnog slijeda ljudskog genoma su smanjeni više od 10.000 puta, s približno 100 milijuna do ispod 1.000 dolara (Slika 4). Ovaj fenomen prati poznati Moorov zakon prema kojemu se mogućnost računalnih procesora udvostručuju svake godine uz smanjenje cijene.



Slika 4. Cijena i količina određivanja nukleotidnih sljedova od 2000. godine na različitim uređajima (Illumina, 2017).

Također, i brzina određivanja nukleotidnih sljedova je drastično smanjenja. Usporedno s brzinom određivanja nukleotidnog slijeda u „Projektu humanog genoma“, uređaj HiSeqX TenSystem, proizveden 2014. godine, nukleotidne sljedove genoma 45 ljudi može odrediti u jednom danu za otprilike 1.000 dolara po genomu (Slika 5).

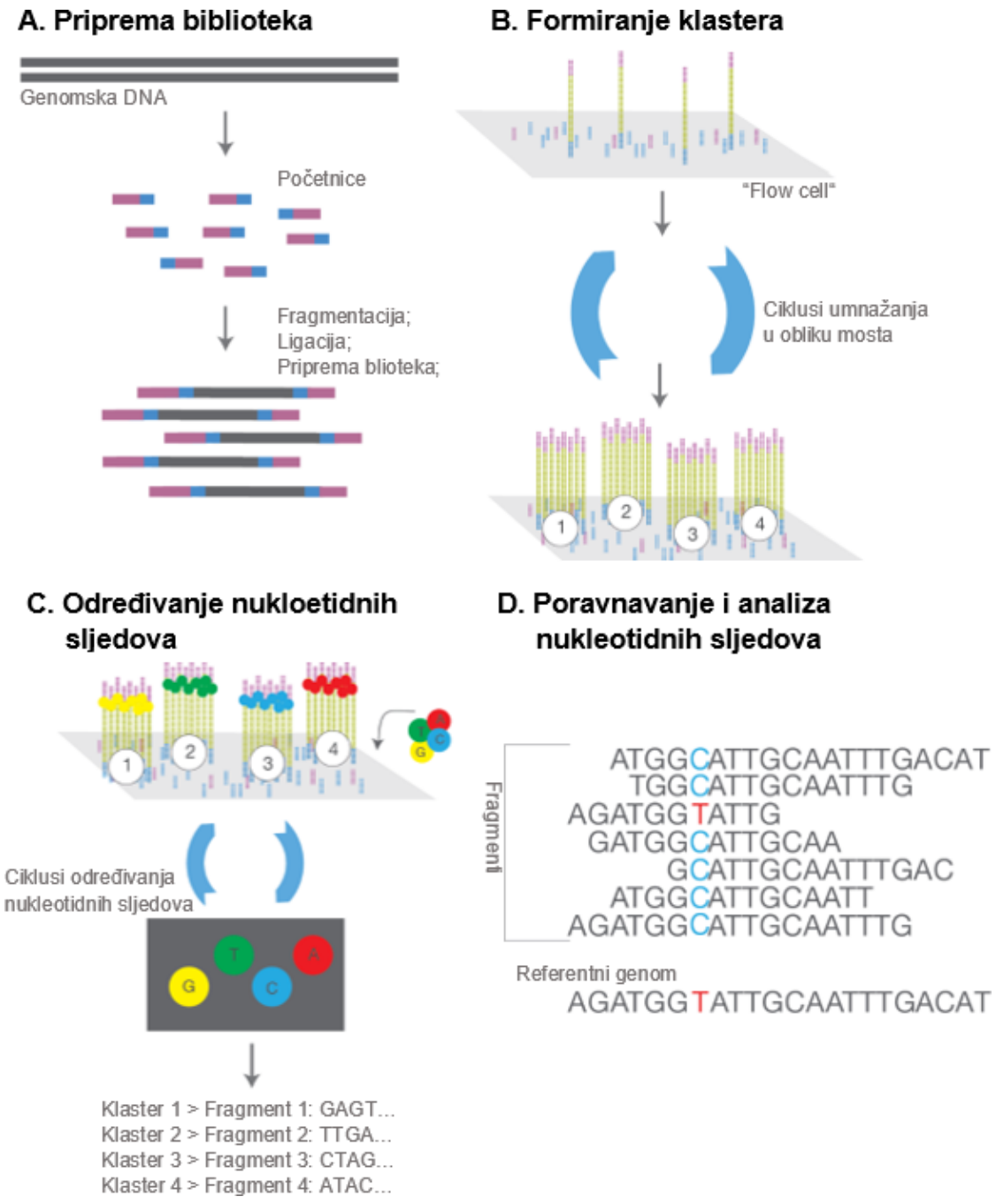


Slika 5. Pregled određivanja nukleotidnog slijeda genoma čovjeka kroz desetljeće. Kapacitet određivanja 3,2 milijardi baznih parova genoma čovjeka eksponencijalno je porastao od 1990. – tih. U 2005. godini, uvođenjem uređaja "Illumina Genome Analyzer System", moguće je bilo odrediti nukleotidni slijed 1,3 genoma. Deset godina kasnije, s uređajem "Illumina HiSeq X Ten", broj genoma kojima je određen nukleotidni slijed je porastao na 18.000 u godinu dana (Illumina, 2017).

Određivanje nukleotidnih sljedova druge generacije je poznato još kao i masivno paralelno određivanje nukleotida DNA jer uključuje metode kojima se milijunima predložaka DNA (engl. template), određuju nukleotidi u isto vrijeme, u jednoj reakciji. Koncept metode određivanja nukleotida druge generacije se može podijeliti u četiri glavna koraka (Illumina, 2017):

1. **Priprema biblioteka** (engl. library) – priprema biblioteka se vrši iz fragmentirane DNA uz dodavanje početnica (engl. adapters) na krajeve svakog fragmenta koji omogućuju umnažanje i određivanje nukleotida (Slika 6A).
2. **Formiranje klastera** - jednolančani fragmenti DNA se vežu na čvrstu površinu (engl. flow cell) i umnažaju lančanom reakcijom polimeraze (engl. polymerase chain reaction – PCR) oblika mosta tzv. "bridge amplification", kojom se stvaraju milijuni prostorno odvojenih klastera tj. grupiranih DNA fragmenata (predložaka) (Slika 6B).
3. **Određivanje nukleotidnih sljedova** - milijunima predložaka se paralelno određuju nukleotidni sljedovi pomoću lasera koji prate ugrađivanje fluorescentnih nukleotida (Slika 6C).
4. **Analiza nukleotidnih sljedova** – korištenjem bioinformatičkih softwera, nukleotidni sljedovi dobiveni iz velike zbirke preklapajućih fragmenata se poravnavaju na referentni genom kako bi se dobio kontinuirani genomski nukleotidni slijed (npr. mitogenom) (Slika 6D). Nakon poravnavanja moguće je provesti više različitih analiza u cilju

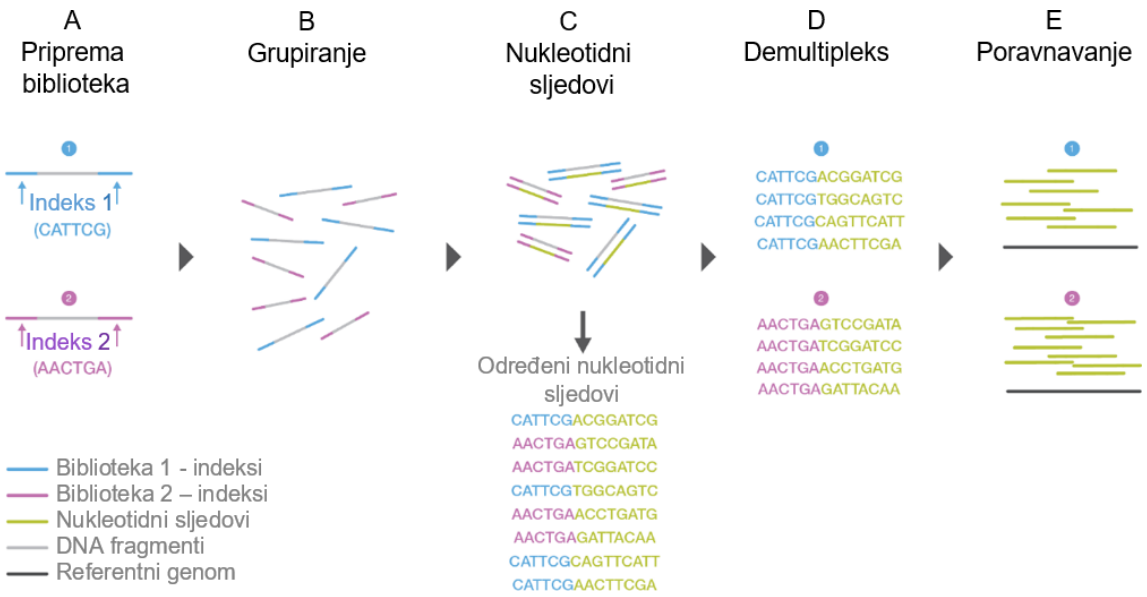
identifikacije varijabilnosti kao što su polimorfizam jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism – SNP) ili indel insercije-delecije.



Slika 6. Pregled određivanje nukleotidnih sljedova druge generacije kroz četiri koraka: (A) priprema bibilioteka, (B) formiranje klastera (C) određivanje nukleotidnih sljedova, (D) analiza nukleotidnih sljedova (Illumina, 2017).

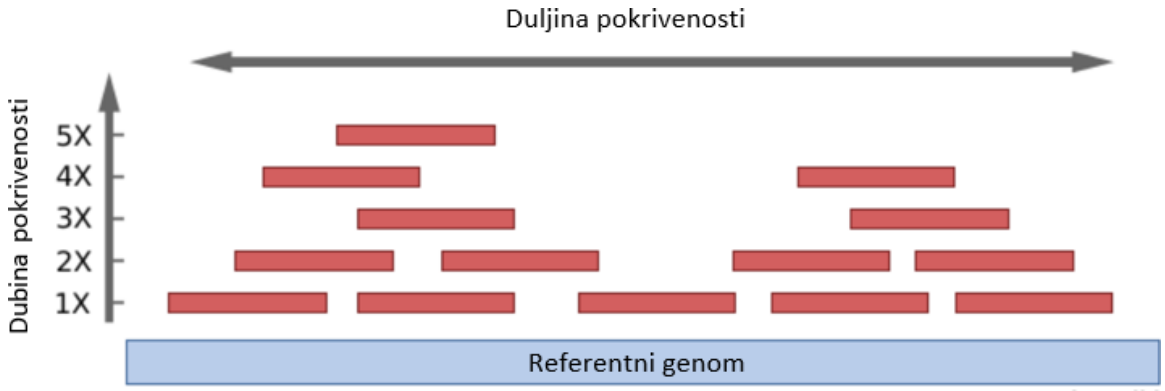
Uslijed neprestanog razvoja tehnologije druge generacije, uz povećanje izlaznih podataka po jednom ciklusu određivanja nukleotidnih sljedova, povećao se i broj DNA uzoraka koji mogu biti istovremeno analizirani. Takav pristup, tzv. multipleks, omogućuje

pripremanje grupa (engl. pool) velikog broja biblioteka različitih uzoraka, metodom dodavanja indeks početnica (engl. index) svakom DNA fragmentu, što omogućuje njihovu identifikaciju. Nakon određivanja nukleotidnih sljedova, kompjuterskom obradom se vrši sortiranje i razdvajanje DNA fragmenata pojedinog uzorka (engl. demultiplex) prije završnog poravnanja na referentni genom (Slika 7).



Slika 7. Pregled pripremanja multipleks biblioteka. (A) Specifične indeks početnice su dodane tijekom pripremanja biblioteka dva uzorka. (B) Biblioteke su grupirane zajedno. (C) Istovremeno su određeni nukleotidni sljedovi obje biblioteke i eksportirane u jednoj podatkovnoj datoteci (D). Kompjuterskom obradom, demultipleks algoritmima, DNA fragmenti su razdvojeni i soritrani u dvije podatkovne datoteke na osnovu indeksa. (E) Svaki set DNA fragmenata pojedinog uzorka je poravnat na odgovarajući referentni genom (Illumina, 2017).

Za razliku od Sangerove metode određivanja nukleotidnih sljedova gdje se kvaliteta nukleotida provjerava očitovanjem pikova elektroforegrama, kvaliteta određivanja nukleotidnih sljedova druge generacije se temelji na pokrivenosti (engl. coverage). Dvije su vrste pokrivenosti: a) dubina pokrivenosti (engl. depth of coverage) je prosječni broj očitanja pojedinog nukleotida u rekonstruiranom genomu. Izračunava se kao broj nukleotida svih kratkih sljedova koji odgovaraju genomu podijeljenim s dužinom tog genoma. Često se izražava kao 1X, 2X, 3X, ... (1, 2 ili 3 puta pokrivenost); b) duljina pokrivenosti (engl. breadth of coverage) je udio očitanih nukleotida refrenetnog genoma s određenom dubinom pokrivenosti (Slika 8). Na primjer, 90% genoma je pokriveno dubinom 5X.



Slika 8. Primjer dubine i duljine pokrivenosti genoma (Scholz, 2018).

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Strategija uzorkovanja i korišteni podaci

3.1.1. Analiza pedigrea

U svrhu uzorkovanja holstein jedinki korišten je pedigre i podaci o proizvodnim mliječnim svojstvima (količina mlijeka, mliječne masti i proteina) iz baze podataka Hrvatske poljoprivredne agencije. Za potrebe tipizacije mitogenoma, prema pedigre podacima iz 2016. godine, od 20.973 jedinki u laktaciji, uzorkovano je 109 holstein krava. Uzorkovanje se ograničilo na jedinke rođene između 2010. i 2013. godine kako bismo bili sigurni da jedinke nisu izlučene iz proizvodnje.

3.1.2. Strategija uzorkovanja - Magellan softvare

Kao pomoć za optimalnu strategiju uzorkovanja za molekularne analize, provjeru točnosti pedigrea, identificiranje rodova i dodjeljivanje odgovarajućih mitogenoma jedinkama u pedigreu koristio se MaGelLAn 1.0 softver (Ristov i sur., 2016), koji je izrađen i testiran u okviru projekta IP-11-2013-9070 "Utilisation of the whole mitogenome in cattle breeding and conservation genetics" - "MitoTAUROmics" (2014-2018) kao i ove disertacije. Glavna namjena MaGelLAn 1.0 softvera je upravo pomoć pri kvantitativnim i populacijsko genetskim analizama citoplazmatskog (majčinog) nasljeđivanja kombinacijom molekularnih podataka i pedigrea. Istaknuo bih da je smanjen napor upravljanja i pripreme velikih pedigrea u procesuiranju informacija vezanih za analizu rodova.

Softver MaGelLAn 1.0 je besplatan i sastoji se od četiri modula: mag_verif, mag_stat, mag_calc i mag_sampl. Moduli su skripte napisane u programskom jeziku Python 3.0 (Van Rossum, 2009) koje se mogu pokrenuti na bilo kojem sistemu gdje je Python 3.0 instaliran. Također, moduli su nazvani prema njihovoj glavnoj funkciji:

1. **Mag_verif modul** - služi za provjeru točnosti pedigrea kroz pronalazak nedosljednosti haplotipova u rodu, izračunava stope haplotip pogreške i pronalazi standardne greške pedigrea kao što su ciklička greška (jedinka se ponavlja kao svoj roditelj) i greška u spolu. Prije korištenja ostalih modula, pedigre ne smije sadržavati navedene greške.

2. **Mag_stat modul** - prikazuje ispis svih jedinki koje pripadaju određenom utemeljitelju roda s odgovarajućim haplotipom i dodjeljuje haplotip svakoj jedinki u pedigreu (povezanost između fenotipa i haplotipa mitogenoma).

3. **Mag_calc modul -** računa efektivnu veličinu populacije odvojeno za utemeljitelje rodova, utemeljitelje haplotipova i utemeljitelje linija.

4. **Mag_sampl modul** - izračunava ciljani broj jedinki tako da izabire jedinke koje pružaju najveći potencijal haplotipne raznolikosti rodova, uzimajući u obzir dostupne jedinke ili uzorke jedinki koje su već pohranjeni u lokalnu banku gena. Na taj način se smanjuje trošak tipizacije.

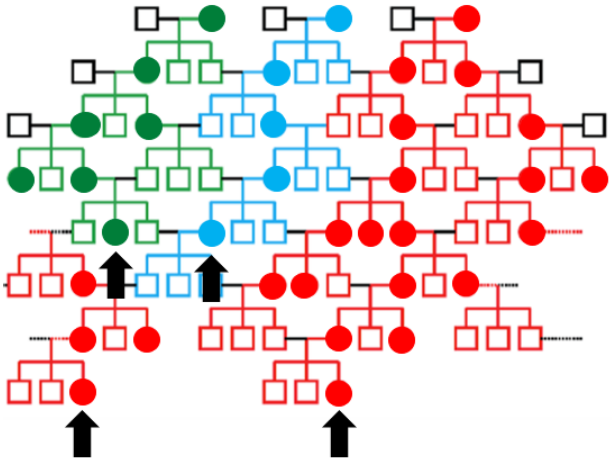
Strategija uzorkovanja se sastojala od sljedećih koraka:

1. Sastav pedigre holstein goveda od 295.349 jedinki rođenih između 1928. i 2015. godine i broj dostupnih fenotipskih podataka o proizvodnji mlijeka, lakoći teljenja i ocjeni vanjštine je prikazan u Tablici 4. Broj jedinki s nepoznatom godinom rođenja iznosi 192, a 153.471 jedinki je imalo sva tri tipa spomenutih fenotipskih podataka.
2. Točnost pedigrea je provjerena mag_verif modulom, a mag_stat modulom je utvrđena pripadnost jedinki određenom utemeljitelju roda prema specifičnosti citoplazmatskog nasljeđivanja.
3. Nakon toga, sumirani su fenotipski podaci (proizvodnja mlijeka, lakoća teljenja i ocjena vanjštine) svih jedinki za svakog utemeljitelja roda te se na taj način dobila informacija o utemeljiteljima rodova koji sadrže najviše fenotipskih podataka što je vidljivo iz Tablice 17 pod kolonom “Sum“.
4. Nakon sortiranja, od 20.973 (rođenih između 2010. i 2013. godine) aktivnih jedinki u laktaciji 2016. godine, odabrano je 109 jedinki za uzorkovanje kao predstavnike 109 rodova koji ulaze u 200 rodova s najviše fenotipskih podataka za sva tri spomenuta svojstva. U prilogu Tablice 17, nalazi se kolona “redni“ iz koje je vidljivo rangiranje pojedinih rodova prema broju fenotipskih podataka unutar 200 rodova.
5. Prema citoplazmatskom nasljeđivanju (Slika 9), 109 jedinki koje predstavljaju 109 rodova je obuhvatilo ukupno 2.373 jedinke pedigrea i njihove fenotipske podatke, podrazumijevajući da će svaki rod imati određen nukleotidni slijed mitogenoma. U ovoj disertaciji koristit će se fenotipski podaci o proizvodnim mliječnim svojstvima (količina mlijeka, količina mliječne masti i količina proteina). Razlog zašto su se obuhvatili fenotipski podaci lakoće teljenja i ocjena vanjštine jest da se slično istraživanje utjecaja polimorfizma mitogenoma može ponoviti i na tim svojstvima.
6. Jedinke koje su imale vrijednosti količine mlijeka <3.000 kg po laktaciji (305 dana), nisu korištene u analizi.
7. Broj jedinki koji je obuhvaćao svaki rod je bio od 7 do 64 (Tablica 17, kolona “Freq“).

8. Sezone teljenja unutar godine su definirane kao: proljeće (od ožujka do svibnja), ljeto (od lipnja do kolovoza), jesen (od rujna do studenog) i zima (od prosinca do veljače).

Tablica 4. Struktura pedigrea s fenotipskim podacima.

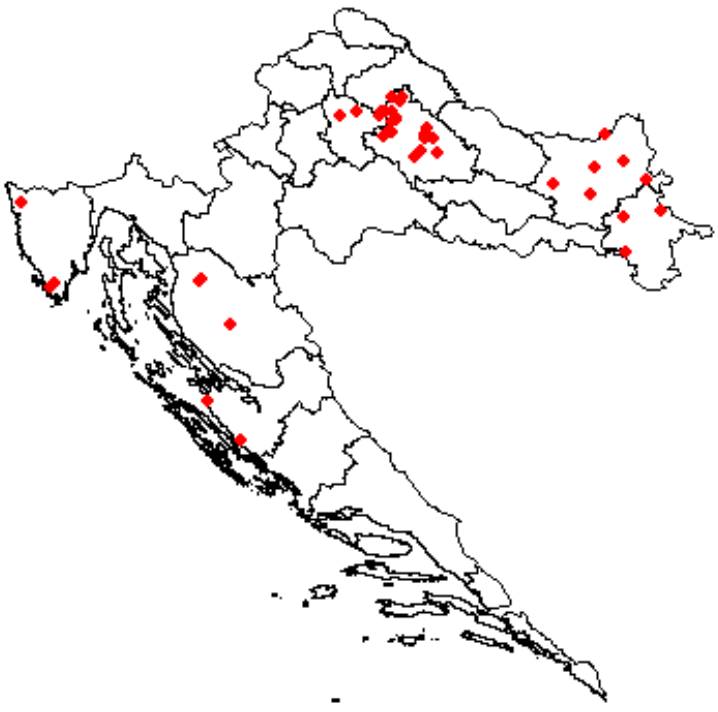
Stavka	N
Ukupan broj jedinki	295.349
Oba roditelja poznata	230.834
Otac poznat	210.739
Majka poznata	222.148
Jedinke s nepoznatom godinom rođenja	192
Ukupan broj jedinki s fenotipskim podacima za:	
• Proizvodnju mlijeka	78.395
• Lakoću teljenja	134.630
• Ocjenu vanjštine	14.358
• Jedinke koje obuhvaćaju sve tri vrste fenotipskih podataka	153.471



Slika 9. Princip citoplazmatskog nasljeđivanja (Venema, 2014).

3.1.3. Prikupljanje uzoraka mlijeka, dlake i tkiva

Prikupljanje uzoraka mlijeka, dlake i tkiva holstein goveda provodilo se na malim (10-30 krava), srednjim i većim (30-100 krava) te velikim (>100 krava) farmama koje su registrirane u Hrvatskoj poljoprivrednoj agenciji. Prikupljeni uzorci pokrivaju 7 županija i 40 farmi, čija se lokacija može vidjeti na Slici 10, a popis svih farmi, mjesta i županija u prilogu uTablice 17. Sveukupno je prikupljeno 109 uzoraka materijala od čega 86 uzoraka mlijeka, 22 uzorka dlake i 1 uzorak tkiva (uho). Prije uzorkovanja mlijeka, provedena je preliminarna analiza ekstrakcije DNA iz mlijeka (sedimentiranih somatskih stanica u obliku peleta) tri različita volumena (50 – 10 – 1.5 ml) uzimajući u obzir svježe mlijeko skladišteno na +4 °C u trajanju do 4 dana ili na -80 °C u trajanju do 24 dana (Brajković i sur., 2018). Ovom analizom utvrđeno je da se iz volumena 50 ml mlijeka ekstrahira najbolja koncentracija DNA i da skladištenje uzoraka u navedenim uvjetima ne utječe na smanjenje kvantitete i kvalitete ekstahirane DNA. To saznanje je omogućilo istovremeno uzorkovanje više jedinki (pogotovo na velikim farmama) bez bojazni da će se uzorci mlijeka pokvariti prije postupka ekstrakcije s obzirom da je sam postupak vremenski, ali i količinski ograničen. Neinvanzivna metoda sakupljanja mlijeka i dlake iz repa, pokazala se dobrim izborom u pogledu rutinskog izvođenja, cijene, ali i stresa prilikom hvatanja i rukovanja sa životinjom.



Slika 10. Lokacije farmi na kojima su prikupljani uzorci.

3.2. Molekularno-genetičke analize

3.2.1. Ekstrakcija DNA iz mlijeka, dlake i tkiva

Komercijalno dostupan komplet reagencija, DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany) je korišten za ekstrakciju DNA iz uzoraka holstein goveda. DNA ekstrakcija je provedena prema uputama proizvođača s nekoliko modifikacija ovisno o tipu uzorka, što je u ovom slučaju, mlijeko, dlaka ili tkivo.

DNA iz 87 uzoraka mlijeka je ekstrahirana prema modifikaciji Usman i sur. (2014):

1. Volumen od 50 ml mlijeka je centrifugiran 20 min na 2.000 x g kako bi se izdvojila mast, a sedimentirale somatske stanice, u obliku peleta, na dnu epruvete.
2. Koristeći sterilnu žlličicu, sloj masti je bačen, a supernatant uklonjen.
3. Peletirane somatske stanice su otopljenje u 200 µl PBS (fosfatni pufer), prebačene u epruvetu od 1.5 ml te je dodano 20 µl proteinaze K i 200 AL (pufer za liziranje).
4. Sadržaj je promiješan i inkubiran na 56 ºC u vodenoj kupelji u trajanju od 10 min.
5. Dodano je 200 µl etanola (96-100%) te je sadržaj ponovno promiješan.
6. Slijedio je postupak daljnjih analiza po protokolu proizvođača od a) do d).

Modifikacija za ekstrakciju DNA iz 21 uzorka dlake repa:

1. U epruvetu volumena 1.5 ml je stavljeno 30 do 70 folikula dlake rezanih na 0.5 cm.
2. Dodano je 300 µl ATL (pufer za liziranje), 20 µl proteinaze K te 20 µl 1M DTT (dithiothreitol).
3. Sadržaj je promiješan i inkubiran na 56 ºC u vodenoj kupelji u trajanju od 1h.
4. Sadržaj je promiješan. Dodano je 300 µl pufera AL te je ponovno promiješan.
5. Dodano je 300 µl etanola (96-100%) te je sadržaj promiješan.
6. Slijedio je postupak daljnjih analiza po protokolu proizvođača od a) do d).

DNA iz 1 uzorka tkiva uha je ekstrahirana sljedećim postupkom:

1. Prvo je izrezano 25 mg tkiva u male komadiće, prebačeno u epruvetu volumena 1.5 ml te dodano 180 µl pufera ATL i 20 µl proteinaze K.
2. Sadržaj je promiješan i inkubiran na 56 ºC u vodenoj kupelji dok se tkivo nije razgradilo (2 h). Vrijeme lize (razgradnje) ovisi o vrsti tkiva. Obično traje 1 do 3 h.
3. Nakon lize, sadržaj je promiješan. Dodano je 200 µl pufera AL te je sadržaj ponovno promiješan .
4. Dodano je 200 µl etanola (96-100%) te je sadržaj ponovno promiješan.
6. Slijedio je postupak daljnjih analiza po protokolu proizvođača od a) do d).

Postupci daljnih analiza po protokolu proizvođača od a) do d), koji su primijenjeni na sva tri tipa uzorka.

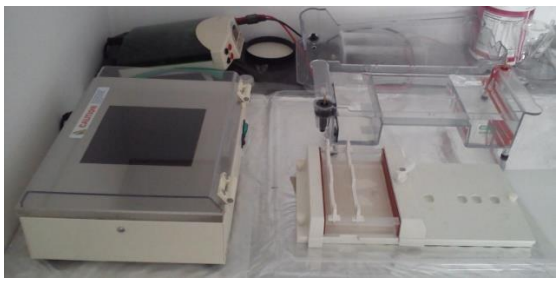
a) Sadržaj se prebacio u DNeasy Mini spin kolonu stavljenu u epruvetu volumena 2 ml. Sadržaj je centrifugiran na ≥6.000 x g (8.000 rpm) 1 min te zajedno s epruvetom uklonjen.
b) DNeasy Mini spin kolona je stavljena u novu epruvetu volumena 2 ml, dodano je 500 µl AW1 (pufer za ispiranje) te se centrifugiralo 1 min na ≥6.000 x g (8.000 rpm). Centrifugirani sadržaj zajedno s epruvetom je ponovno uklonjen
c) DNeasy Mini spin kolona se opet stavila u novu epruvetu volumena 2 ml, dodano je 500 µl AW2 (pufer za ispiranje) te se centrifugiralo 3 min na 20.000 x g (14.000 rpm). Centrifugirani sadržaj zajedno s epruvetom je ponovno uklonjen
d) Na kraju je DNeasy Mini spin kolona stavljena u novu epruvetu volumena 1.5 ml te je pipetirano 200 µl AE (pufer za eluiranje) direktno na DNeasy membranu. Sadržaj je inkubiran 3 min na sobnoj temperaturi i onda centrifugiran 1 min na ≥6.000 x g (8.000 rpm). Centrifugirani sadržaj je ekstrahirana DNA volumena 200 µl. DNA je pohranjena na -80 ºC.

3.2.2. Provjera kvantitete i kvalitete ekstrahirane DNA

Kvantiteta i čistoća ekstrahirane DNA je određena uređajem NanoPhotometer P330 Spektrofotometer (IMPLEN, Njemačka) (Slika 11). Koncentracija DNA je izmjerena u volumenu 1 µl, u jedinicama µl/ng. Čistoća DNA je određena omjerom apsorbancije pri valnim duljinama 260nm i 280nm (A260/A280). Ako je omjer apsorbancija unutar raspona od 1,8 do 2, DNA je čista. Ukoliko je DNA kontaminirana ostacima proteina i fenola, omjer A260/A280 je < 1,8, dok omjer A260/A280 > 2 ukazuje na RNA kontaminaciju. Kvaliteta (integritet) ekstrahirane DNA je provjerena gel elektroforezom (Slika 12). Volumen uzoraka od 5 µl DNA je analiziran na 1% agaroznom gelu, uz dodatak etidijevog bromida (13 µl / 100 ml gel), 45 minuta na 120 V. Integritet DNA je vizualiziran koristeći UV transiluminator i uređaj za snimanje gela UVItech explorer Version 15.01.c (UVItec Ltd., Cambridge, UK) (Slika 13). Integritet DNA na gel elektroforezi nalazi se u prilogu na Slici 19, a koncentracija i čistoća ekstrahiranih uzoraka nalazi se u prilogu Tablice 17. Deskriptivna statistika DNA koncentracije i čistoće izračunata je koristeći SAS 9.4 (SAS, 2015).



Slika 11. Uređaj NanoPhotometer P330 Spektrofotometer (IMPLEN, Njemačka) za mjerenje koncentracije DNA (Brajković, 2018).



Slika 12. UV transiluminator i uređaj za vodoravnu elektroforezu (Brajković, 2018).



Slika 13. UV transiluminator i uređaj za snimanje gela UVItech explorer Version 15.01.c (UVItec Ltd., Cambridge, UK) (Brajković, 2018).

3.2.3. Umnažanje mitogenoma PCR-om u 3 koraka

Umnažanje cijelog mitogenoma goveda (~ 16.340 bp) provedeno je lančanom reakcijom polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction - PCR) koristeći Mastercycler®nexus gradient (Eppendorf, Njemačka) (Slika 14). Umnožena su 3 preklapajuća fragmenta prema modificiranom protokolu Horsburgh i sur. (2013) (Tablica 5). Korištene početnice, pozicije umnažanja kao i veličina umnoženih fragmenata mitogenoma, prikazane su u Tablici 6.



Slika 14. Mastercycler®nexus gradient (Eppendorf, Njemačka) (Brajković, 2018).

Tablica 5. Korišteni reagensi i dijelovi PCR reakcije.

Reagensi: (Promega, SAD)	**µl**	**Dijelovi PCR reakcije**	**Temperatura /ºC**	**min'/ sec''**
GoTaqLong PCR Master Mix	12,5	Početna denaturacija	94	2'
Početnica F „upstream“	1,8	35 ciklusa:		
Početnica R „downstream“	1,8	Denaturacija	94	30''
H_2O destilirana sterilana	7,9	Vezivanje početnica	58	30''
DNA	1,0	Sinteza kompl. lanaca	72	6'
Ukupno	25,0	Završno produživanje lanaca	72	10'

Tablica 6. Korištene početnice, pozicije umnažanja i veličina umnoženih fragmenata.

Početnice	Sekvence početnica	Početak (bp)	Kraj (bp)	Veličina umnoženenog dijela mitogenoma (bp)
MitoBt1	ccgtcaccctcctcaaatag	1.272	7.904	6.631
MitoBt1	ctgggattgcgtctgttttt	7.904	1.272	
MitoBt2	gatgccctccaccatatcac	7.197	13.676	6.498
MitoBt2	gaacttgaaggcgtttgagg	13.676	7.197	
MitoBt3	tacacgggaaaatgcactca	11.819	2.322	6.803
MitoBt3	ggaatgctggaggtgatgtt	2.322	11.819	

Za provjeru uspješnosti PCR reakcije, 2 µl umnožene DNA je provjereno elektroforezom na 1% gelu u trajanju od 20 min na 80 V.

3.2.4. Pročišćavanje PCR produkata

Umnožena tri fragmenta mitogenoma, svakog uzorka, su prebačeni u epruvetu volumena 1,5 µl te su pročišćeni prema protokolu Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, SAD):

1. U epruvetu gdje su skupno prebačena umnožena tri fregmenta, dodan je dvostruko veći volumen „Membrane Binding Solution“ (MBS) u odnosu na volumen fragmenata.
2. SV Mini kolona je prebačena u epruvetu za skupljanje volumena 1,5 ml te je dodana jedna kap MBS-a u sredinu kolone.
3. Pripremljeni PCR produkt je prebačen u SV Mini kolonu i inkubiran na sobnoj temperaturi u trajanju od 4 min.
4. Sadržaj je centrifugiran na 16.000 x g 1 min. Centrifugirani sadržaj je uklonjen te je SV Mini kolona ponovno prebačena u epruvetu za skupljanje.
5. U SV Mini kolonu je dodano 700 µl „Membrane Wash Solution“ (MWS) te je sadržaj centrifugiran na 16.000 x g 1 min. Centrifugirani sadržaj je ponovno uklonjen te je SV Mini kolona ponovno prebačena u epruvetu za skupljanje.
6. Korak 5 je ponovljen s 500 µl MWS. Sadržaj je centrifugiran na 16.000 x g 5 min.
7. Centrifugirani sadržaj je ponovno uklonjen te je SV Mini kolona ponovno prebačena u epruvetu za skupljanje i centrifugirana još jednom u trajanju od 1 min.

8. SV Mini kolona je prebačena u čistu epruvetu volumena 1,5 µl.
9. U SV Mini kolonu je dodano 30 µl „Nucelase-Free“ vode. Sadržaj je inkubiran na sobnoj temperaturi 3 min te centrifugiran na 16.000 x g 1 min.
10. SV mini kolona je uklonjena, a pročišćena DNA pohranjena na -20 °C.

3.2.5. Priprema biblioteka za određivanje sljedova druge generacije i određivanje slijeda nukleotida

Priprema PCR produkata za kreiranje DNA biblioteka u svrhu određivanja slijeda nukleotida, provela se prema protokolu Nextera®XT DNA Sample Preparation Guide. Zbog opsežnosti protokola, spomenuti su glavni koraci pripreme DNA knjižnica:

1. Fragmentiranje DNA i dodavanje adaptera
   Koristeći „Nextera XT trasnsposome“ enzime, DNA se fragmentirala i simultano su se na krajeve kratkih fragmentiranih odsječaka dodale početnice (engl. adapters), koje omogućuju PCR umnažanje na platformi druge generacije.

2. PCR umnažanje
   Prethodno fragmetirana DNA s dodanim adapterima se podvrgnula novoj PCR reakciji u kojoj se na svaki fragmentirani odsječak dodala kombinacija indeks početnica 1 (i7) i indeks početnica 2 (i5) kako bi se mogle raditi skupne reakcije umnažanja DNA fragmenata biblioteka više različitih uzoraka.

3. Pročišćavanje PCR produkata
   U ovom koraku su se koristile „AMPure XP beads“ kako bi se pročistile DNA bibiloteke i uklonili fragmenti manji od 300 bp.

4. Usklađivanje biblioteka
   Ovim procesom usklađena je količina svake biblioteke kako bi svaka od njih bila jednako zastupljena u skupnim uzorcima.

5. Skupne biblioteke za određivanje sljedova na platformi druge generacije
   U svrhu pripremanja skupnog određivanja nukleotidnih sljedova, jednaki volumeni usklađenih biblioteka su kombinirani, razrijeđeni u puferu i denaturirani prije određivanja nukleotidnih sljedova.

Određivanje slijeda nukleotida mitogenoma provedeno je na platformi druge generacije, HiSeq 1500 System (Illumina, SAD) (Slika 15), u Genetskom centru Sveučilišta u Münchenu (Genzentrum, Ludwig-Maximilians Universität, Münchenu, Njemačka).



Slika 15. HiSeq 1500 uređaj za određivanje slijeda nukleotida druge generacije (CATG, 2014).

3.3. Analiza nukleotidnih sljedova

Sirovi podaci mitogenoma u fastqsanger formatu dobiveni NGS analizama, obrađivali su se koristeći programe Galaxy platforme (Hillman-Jackson i sur., 2012) instalirane na Linux operativnom sustavu. Također, koristili su se sirovi podaci genoma holstein goveda dostupnih iz Europske arhive nukleotida (engl. European Nucleotide Archive, ENA). Koristeći automatizirani protokol (engl. workflow) sastavljen od niza programa Galaxy platforme (Hillman-Jackson i sur., 2012) (Slika 16) cilj je bio dobiti fasta format mitogenoma (konsenzus mitonukleotidni slijed) koji se može koristiti za daljnju obradu, vizualizaciju varijabilnosti nukleotidnih sljedova te konstrukciju haplotipova.

Protokol za dobivanje konsenzus mitonukleotidnog slijeda iz genoma sastojao se od sedam koraka (1A, 2A, 3, 4, 5, 6 i 7A) dok se za dobivanje konsenzus mitonukleotidnog slijeda iz mitogenoma sastojao od pet koraka (3, 4, 5, 6, i 7B), što je vidljivo na Slici 16.

Korišteni formati nukleotidnih sljedova, formati poravnanja nukleotidnih sljedova, formati koji sadrže informacije o varijabilnim mjestima i programi Galaxy platforme su:

Formati nukleotidnih sljedova:

1. FASTQ – format nukleotidnih sljedova koji se dobije kao rezultat uređaja za određivanje nukleotidnih sljedova. Format je sličan FASTA formatu, ali ima oznaku kvalitete svakog čitanja nukeotidnih sljedova.

.

2. FASTA – tekstualni format za prikazivanje sljedova nukleinskih kiselina ili proteina gdje je svaki nukleotid ili nukleinska kiselina prikazan jednim slovom.

Formati poravnanja nukleotidnih sljedova:

1. SAM (engl. sequence alignment/map) – tekstualni format razgraničen tabulatorom koji sadrži sirove podatke i informaciju o poravnanju nukleotidnih sljedova biblioteka na referentni nukleotidni slijed
2. BAM (engl. binary alignment/map) – binarna verzija SAM formata

Formati koji sadrže informaciju o varijabilnim mjestima:

1. VCF (engl. variant call format) – tekstualni format
2. BCF (engl. binary variant call format) - binarna verzija VCF formata

Programi Galaxy platforme i njihova putanja unutar platforme:

1. Get data: EBI SRA ENA SRA → European Nucleotide Archive (ENA) – europska arhiva nukleotida koja obuhvaća sirove podatke genoma kojima je određen nukleotidni sljed (https://www.ebi.ac.uk/ena). ENA-a je sinkronizirana s bankom gena - NCBI (engl.GeBank) (Clark i sur., 2015).
2. Genomic File Manipulation: FASTA/FASTQ → FASTQ Groomer (verzija 1.1.1) – kontrola kvalitete i formatiranje različitih FASTQ formata (Blankenberg i sur., 2010).

3. Genomic analysis: Mapping → BWA (verzija 0.7.10) – algoritam za poravnavanje/mapiranje (engl. alingment/mapping) srednje dugačkih i dugih odsječaka nukleotidnih sljedova (> 100 bp) na referentni genom (Li i Durbin, 2009).

3. Genomic file manipulation: SAM/BAM → Filter SAM or BAM on FLAG MAPQ RG LN or by region (verzija 0.1.10) – filtrira kvalitetu poravnavanja u SAM ili BAM format (Li i sur., 2009a).

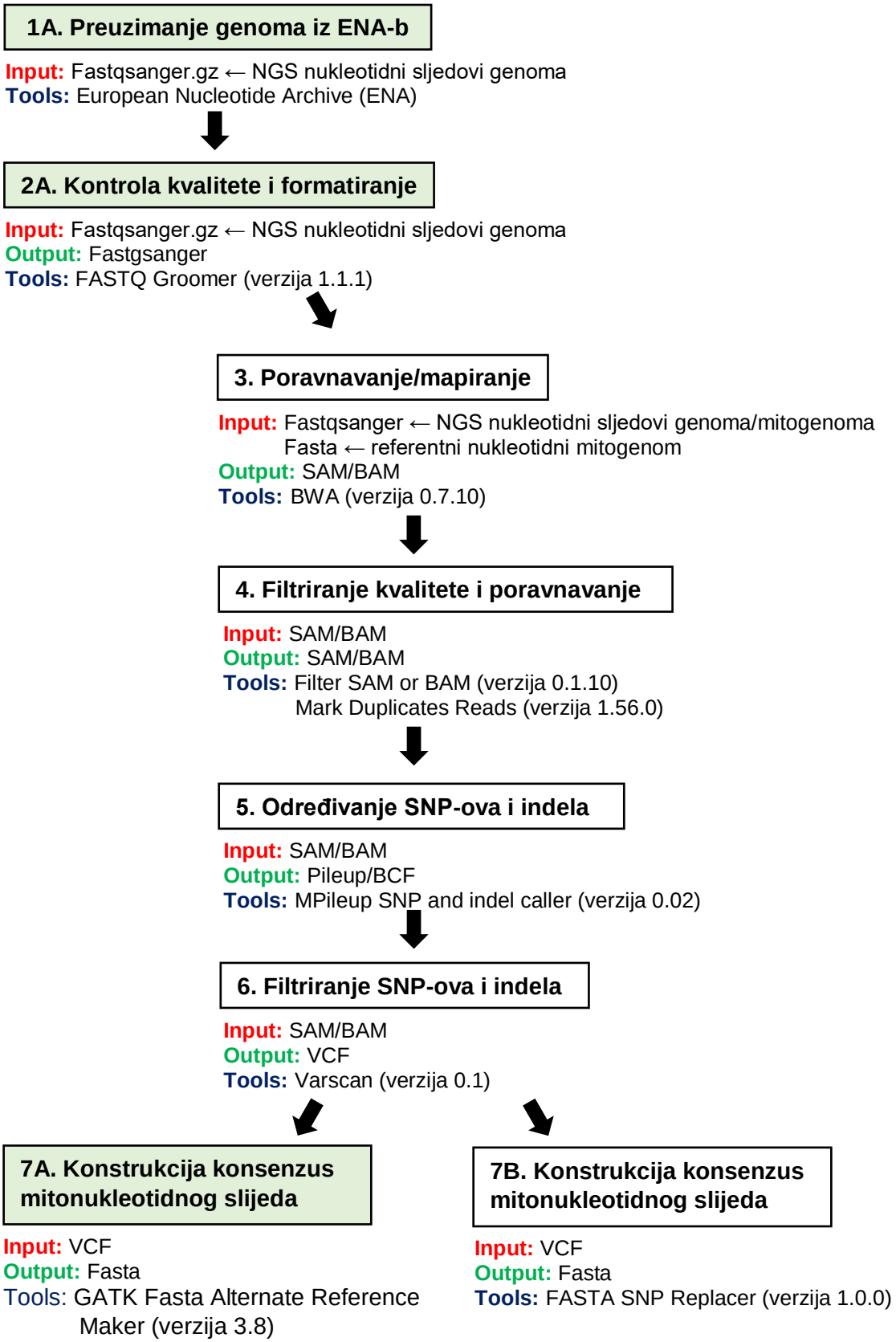
4. Genomics Toolkits: Picard → Mark Duplicates Reads (verzija 1.56.0) - provjerava poravnane nukleotidne sljedove u BAM skupovima podataka kako bi se pronašli duplikati (http://broadinstitute.github.io/picard/).

5. Genomic File Manipulation: SAM Tools → MPileup SNP and indel caller (verzija 0.02) – određuje polimorfizme jednog nukleotida (engl. Single nucleotide polymorphism – SNP) te indel insercije i delecije (Li i Durbin, 2009).

6. Genomics Analysis: Variant calling → Varscan (verzija 0.1) – prema zadanim kriterijima filtrira polimorfizme jednog nukleotida i indele (Koboldt i sur., 2012).

7. FASTA SNP Replacer (verzija 1.0.0) – izmjenom filtriranih polimorfizama jednog nukleotida i indela na referentnom nukleotidnom slijedu, konstruira se konsenzus nukleotidni slijed, tj. nukleotidni slijed specifičan za određenu jedinku (Genzentrum, Ludwig-Maximilians Universität, Münchenu, Njemačka).

8. GATK → FastaAlternateReferenceMaker (verzija 3.8) (McKenna i sur., 2010; DePristo i sur., 2011; Van der Auwera i sur., 2013) – program koji ima istu namjenu kao prethodno spomenuti FASTA SNP Replacer, ali se pokreće direktno iz linije koda na Linux operativnom sustavu, neovisno o Galaxy platformi (Hillman-Jackson i sur., 2012).



Slika 16. Protokol za obradu sirovih fastqsanger podataka u cilju dobivanja konsenzus mitonukleotinog slijeda u fasta formatu.

Za vizualizaciju dubine i duljine pokrivenosti (engl. depth/breadth of coverage) nukleotidnih sljedova dobivenih metodom određivanja nukleotidnih sljedova druge generacije, korišten je program IGV - Integrative Genomics Viewer (Robinson i sur., 2011). Program BBmap (Bushnell, 2016) korišten je za izračun prosječne dubine pokrivenosti svake baze nukleotidnog slijeda kao i prosječne duljine pokrivenosti mitogenoma.

3.3.1. Analiza varijabilnosti mitogenoma

Kako bi se utvrdila varijabilnost nukleotidnih sljedova mitogenoma, holstein goveda korišteni su sljedeći programi:

1. Za poravnavanje 109 nukleotidnih sljedova mitogenoma uz referentni mitogenom goveda (Anderson i sur., 1982), korišten je program Clustal Omega (Sievers i sur., 2011).
2. U svrhu vizualizacije i provjere poravnanja nukleotidnih sljedova mitogenoma je korišten program MEGA7 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets (Kumar i sur., 2016). Također, isti program je korišten za određivanje varijabilnih mjesta, parsimonijskih informativnih mjesta (engl. parsimony informative sites) i singleton mjesta Parsimonijska informativna mjesta su vrsta varijabilnih mjesta u setu nukleotidnih sljedova koja se pojavljuju najmanje u dva nukleotidna slijeda dok su singleton mjesta, varijabilna mjesta specifična samo za jedan nukleotidni slijed.

3.3.2. Konstrukcija i vrste haplotipova/haplogrupa

Za provjeru utjecaja polimorfizama mitogenoma na fenotipsku varijancu mliječnih svojstava holstein goveda, konstruirane su tri vrste haplotipova/haplogrupa:

1. Haplotipovi mitogenoma - konstruirani na temelju svih varijabilnih mjesta cijelih nukleotidnih sljedova analiziranih mitogenoma koristeći program DNAsp v5 (Librado i Rozas, 2009) i MEGA7 (Kumar i sur., 2016).

2. Haplotipovi aminokiselina - konstruirani na temelju varijabilnih mjesta aminokiselinskih sljedova 13 protein kodirajućih regija mitogenoma koristeći program MEGA7 (Kumar i sur., 2016) i SAS (SAS, 2015).

3. Evolucijske haplogrupe mitogenoma – preuzete iz analize (Cubric-Curik i sur., u pripremi) gdje se klasifikacija na haplogrupe dobila na temelju MCMC[1] Bayesian evolucijske analize koristeći BEAST v1.4.3 (engl. Bayesian Evolutionary Analysis Sampling trees) softverski paket (Suchard i sur., 2018). Spomenuta analiza je bazirana na temelju 809 mitogenoma koji obuhvaćaju 114 poznatih pasmina goveda te nekoliko radiokarbonski datiranih uzoraka primigenih goveda i bizona korištenih za kalibraciju molekularnog sata. Prema dosadašnjem pregledu literature nepublicirani rad spada u najsveobuhvatnije filogenetsko-evolucijske analize mitogenoma goveda. Dio istraživanja gdje je korištena ista evolucijska analiza, ali na temelju 498 mitogenoma goveda, prikazana je u sažetku Cubric-Curik i sur. (2017).

3.3.3. Filogenetska analiza

Kako bi utjecaj polimorfizama mitogenoma na fenotipsku varijancu mliječnih svojstava holstein goveda bio potpuniji, potrebno je poznavati i filogenetsku pripadnost analiziranih jedinki haplotipova/haplogrupa s obzirom da se i mitogenom tijekom vremena prilagođavao na okoliš. Klasificiranje mitogenoma u određene haplotipove/haplogrupe izvršeno je pomoću programa MitoToolPy (Peng i sur., 2015) (Tablica 17, kolona oznake "MTP"), koji kao referentu bazu koristi 278 mitogenoma roda *Bos* (Bos taurus=266; Bos primigenius= 2; Bos indicus=10). Referentna baza obuhvaća dostupne nukleotidne sljedove mitogenoma pohranjene u banci gena - NCBI (engl. GenBank) (Clark i sur., 2015) do 26.10.2014. godine.

Program PopArt (Leigh i Bryant, 2015) je korišten za izradu median-joining (MJ) mreže (Bandelt i sur., 1999) kako bi se vizualizirao filogenetski odnos haplotipova/haplogrupa analiziranih mitogenoma holstein goveda. Kako su preliminarni rezultati MitoToolPy (Peng i sur., 2015) analize pokazali da holstein goveda pripadaju T1, T2, T3 i T5 haplogrupi (moguće su još I, P, R i Q haplogrupe), za izradu median-joining mreže korišteno je dodatnih 58 nukleotidnih sljedova (Tablica 7) iz banke gena - NCBI (engl. GenBank) (Clark i sur., 2015), koji čine 51 haplotip i 4 različite haplogrupe (T1, T2, T3 i T5). Radi lakše obrade i vizualizacije median-joining mreže PopArt programom (Leigh i Bryant, 2015) za konstrukciju ulazne matrice frekvencije haplotipova korišten je program Arleqin 3.5 (Excoffier i Lischer, 2010).

[1] Metoda simulacije Monte Carlo Markovljevih lanaca

Tablica 7. Mitogenomi *Bos taurus* vrste korišteni za izradu median-joining mreže.

Fasta radno ime	Pasmina	MTP Haplogrupa	Država	Dužina (bp)	Autor/BioProjekt
V00654_REF_T3r	-	T3r	Ujedinjeno Kraljevstvo	16.338	Anderson i sur. (1982)
JN817331_FRA_Limo_T1a	Limousin	T1a	Francuska	16.340	Bonfiglio i sur. (2012)
JN817350_ITA_Chia_T1b	Chianina	T1b	Italija	16.339	Bonfiglio i sur. (2012)
KF163063_ZAF_Ngun_T1b	Nguni	T1b	Južnoafrička Republika	16.342	Horsburgh i sur. (2013)
JN817324_EGY_Domi_T1b	Domiaty	T1b	Egipat	16.340	Bonfiglio i sur. (2012)
JN817305_ETH_Bora_T1b	Boran	T1b	Etiopija	16.340	Bonfiglio i sur. (2012)
EU177848_IRQ_Iraq_T1c	Iraqi	T1c	Irak	16.340	Achilli i sur. (2008)
JN817300_PRT_Alen_T1c	Alentejana	T1c	Portugal	16.339	Bonfiglio i sur. (2012)
KT184458_EGY_Menf_T2x	Menofi	T2x	Egipat	16.339	Olivieri i sur. (2015)
EU177849_GRC_Gree_T2x	Greek	T2x	Grčka	16.339	Achilli i sur. (2008)
EU177850_ITALIJA_Caba_T2x	Cabannina	T2x	Italija	16.340	Achilli i sur. (2008)
EU177858_IRN_Iran_T2x	Iranian	T2x	Iran	16.339	Achilli i sur. (2008)
EU177861_ITALIJA_Rend_T2c	Rendena	T2c	Italija	16.339	Achilli i sur. (2008)
KJ709683_DEU_RMou_T3x	Red Mountain	T3x	Njemačka	16.340	Ludwig i sur. (2016)
AY676861_FRANCUSKA_Char_T3d	Charolais	T3d	Francuska	16.341	*Shahid i sur.
GU947021_USA_Long_T3g	Longhorn	T3g	Sjedinjene Američke Države	16.339	Douglas i sur. (2011)
AY676857_GBR_Angu_T3n	Angus	T3n	Ujedinjeno Kraljevstvo	16.340	*Shahid i sur.
EU177825_ITALIJA_Chia_T3p	Chianina	T3p	Italija	16.339	Achilli i sur. (2008)
GQ129207_HUN_HunG_T3r	Hungarian Grey	T3r	Mađarska	16.341	*Zeyland i sur.
EU177862_ITALIJA_Vald_T5a	Valdostana	T5a	Italija	16.339	Achilli i sur. (2008)
EU177863_ITALIJA_Pied_T5a	Piedmontese	T5a	Italija	16.340	Achilli i sur. (2008)
EU177864_IRQ_Iraq_T5b	Iraqi	T5b	Irak	16.340	Achilli i sur. (2008)
EU177865_IRQ_Iraq_T5b	Iraqi	T5b	Irak	16.340	Achilli i sur. (2008)
KY766256_CHN_HoFr_T3r	Holstein	T3r	Kina	16.339	*Wang i sur.

Tablica 7. Mitogenomi Bos taurus vrste korišteni za izradu median-joining mreže (nastavak).

Fasta radno ime	Pasmina	MTP Haplogrupa	Država	Dužina (bp)	Autor/BioProjekt
KY766257_CHN_HoFr_T3r	Holstein	T3r	Kina	16.339	*Wang i sur.
KY766258_CHN_HoFr_T3o	Holstein	T3o	Kina	16.339	*Wang i sur.
DQ124404_KOR_HoFr_T3	Holstein	T3	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124405_KOR_HoFr_T3	Holstein	T3	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124406_KOR_HoFr_T3	Holstein	T3	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124407_KOR_HoFr_T3o	Holstein	T3o	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124408_KOR_HoFr_T3r	Holstein	T3r	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124409_KOR_HoFr_T3c	Holstein	T3c	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124410_KOR_HoFr_T3c	Holstein	T3c	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124411_KOR_HoFr_T3h	Holstein	T3h	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124412_KOR_HoFr_T4	Holstein	T4	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124413_KOR_HoFr_T3r	Holstein	T3r	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124414_KOR_HoFr_T3	Holstein	T3	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124415_KOR_HoFr_T3r	Holstein	T3r	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124416_KOR_HoFr_T3b	Holstein	T3b	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124417_KOR_HoFr_T3a	Holstein	T3a	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
DQ124418_KOR_HoFr_T3a	Holstein	T3a	Južna Koreja	16.340	*Shin i sur.
EU177847_ITALIJA_Frie_T1c	Friesian	T1c	Italija	16.342	Achilli i sur. (2008)
EU177821_ITALIJA_Frie_T3r	Friesian	T3r	Italija	16.339	Achilli i sur. (2008)
EU177826_ITALIJA_Frie_T3q	Friesian	T3q	Italija	16.341	Achilli i sur. (2008)
EU177827_ITALIJA_Frie_T3q	Friesian	T3q	Italija	16.341	Achilli i sur. (2008)
SRR934414_KOR_HoFr_T3b	Holstein	T3b	Južna Koreja	16.338	PRJNA210521
SRR934413_KOR_HoFr_T3b	Holstein	T3b	Južna Koreja	16.338	PRJNA210521
SRR934412_KOR_HoFr_T3r	Holstein	T3r	Južna Koreja	16.339	PRJNA210521
SRR934411_KOR_HoFr_T3	Holstein	T3	Južna Koreja	16.339	PRJNA210521

Tablica 7. Mitogenomi Bos taurus vrste korišteni za izradu median-joining mreže (nastavak).

Fasta radno ime	Pasmina	MTP Haplogrupa	Država	Dužina (bp)	Autor/BioProjekt
SRR934410_KOR_HoFr_T3r	Holstein	T3r	Južna Koreja	16.339	PRJNA210521
SRR934409_KOR_HoFr_T3	Holstein	T3	Južna Koreja	16.340	PRJNA210521
SRR934408_KOR_HoFr_T3	Holstein	T3	Južna Koreja	16.339	PRJNA210521
SRR934407_KOR_HoFr_T3	Holstein	T3	Južna Koreja	16.340	PRJNA210521
SRR934406_KOR_HoFr_T3	Holstein	T3	Južna Koreja	16.340	PRJNA210521
SRR934405_KOR_HoFr_T3	Holstein	T3	Južna Koreja	16.340	PRJNA210521
SRR1348592_CAN_HoFr_T3	Holstein	T3	Kanada	16.339	Stothard i sur. (2015)/ PRJNA176557
SRR1346386_NLD_HoFr_T3	Holstein	T3	Nizozemska	16.339	Stothard i sur. (2015)/ PRJNA176557
SRR1365147_NLD_HoFr_T3g	Holstein	T3g	Nizozemska	16.339	Stothard i sur. (2015)/ PRJNA176557

Fasta radno ime – sastoji se od pristupnog broja nukleotidnog slijeda banke gena - NCBI (engl. GenBank)(Clark i sur., 2015), ISO-3 kratice države iz koje jedinka potječe, kratice pasmine i MitoToolpy (Peng i sur., 2015) klasifikacijske pripadnosti određenoj haplogrupi; *neobjavljeni radovi (samo priloženi nukleotidni sljedovi); podebljani mitogenomi dobiveni su analizom iz cijelih genoma koji su dostupni u banci gena – NCBI (engl. GenBank) (Clark i sur., 2015) pod brojem bioprojekta.

3.4. Genetičko-statistički modeli

Tijekom 80-tih godina prošlog stoljeća, metoda ograničene maksimalne vjerojatnosti (engl. Restricted maximum likelhood - REML) postala je glavnom metodom za procjenu komponenti varijanca u uzgoju životinja i srodnih disciplina koje pokušavaju podijeliti fenotipsku varijancu na genetsku i ostale komponente. To je omogućeno ne samo povećanjem razina dostupnih računalnih resursa već i specijaliziranih algoritama, koji mogu iskoristiti specifične strukture podataka ili modele analiza kao i korištenje različitih numeričkih tehnika. Do sada, REML metoda se pokazala kao najpraktičnijom u analizi podataka mliječnih goveda. Meyer (1989) je opisao metodu simultanom procjenom komponenti varijanca na temelju nekoliko genetskih i okolišnih utjecaja iz nebalansiranih podataka. Komponente varijanci dobivene su procjenom vjerojatnosti i koristeći standardnu optimizacijsku proceduru bez derivacija kako bi se locirao njihov maksimum. Model takve analize je takozvani "Animal Model" koji uključuje aditivnu genetsku vrijednost životinje kao slučajni utjecaj te uključuje sve informacije o povezanosti između životinja. Slučajni utjecaji kao što su utjecaj majke, dominantni utjecaj ili stalni okolišni utjecaj također su uzeti u obzir.

3.4.1. Model

Za procjenu utjecaja mitogenoma na ukupnu varijancu proizvodnih mliječnih svojstava koristio se linearni mješoviti model – univarijatni "Animal Model":

$$y_{jklmop} = \mu + b_1\left(x_{jklmop} - \mu_{\bar{x}}\right) + R_j + s_{kl} + h_{mo} + a_o + e_{jklmop}$$

gdje su količina mlijeka (y_{jklmop}), količina mliječne masti (y_{jklmop}) i količina proteina (y_{jklmop}) definirane kao zavisne varijable. Dob prilikom prvog teljenja (x_{jklmop}) definirana je kao kontinuirana nezavisna varijabla te modelirana kao linearna regresija. Županija (R_j) je definirana kao fiksni utjecaj. Utjecaji interakcije stado-godina-sezona (s_{kl}), utjecaj citoplazmatskog (mitohondrijskog) nasljeđivanja (m_{mo}) i izravni aditivni genetski utjecaj (a_o) uključeni su u model kao slučajni utjecaji.

Utjecaj citoplazmatskog (mitohondrijskog) nasljeđivanja (m_{mo}) na ukupnu varijancu proizvodnih mliječnih svojstava proučavao se zasebno za prve tri laktacije po proizvodnom svojstvu i to u četiri oblika u navedenom modelu:

a) citoplazmatski model s rodovima dobivenih iz pedigrea (CITO-MODEL)

b) model haplotipova mitogenoma (HAPLO-MODEL)

c) model aminokiselinskih haplotipova mitogenoma (AMINO-MODEL)

d) model evolucijskih haplogrupa na temelju MCMC Bayesian filogenetske analize (EVOL-MODEL).

Komponente varijance i heritabilitet procijenjeni su REML metodom (engl. Resticted maximum likelihood) koristeći MTDFREML program (engl. Multiple Trait Derivate Free Restricted Maximum Likelihood) (Boldman, 1993). MTDFREML koristi simpleks metodu određivanja maksimuma likelihood funkcije (L). Pretpostavlja se da je iterativna procedura konvergirala kada se varijanca od -2log(L) u simpleksu smanji ispod 10^{-9}. Važno za spomenuti je velika brzina kojom MTDFREML procjenjuje komponente varijance i heritabilitet u odnosu na MIXED proceduru statističkog programa SAS 9.4 (SAS, 2015). Kako bi se ubrzala procjena komponenti varijanci i heritabiliteta MIXED procedurom u SAS-u 9.4 (SAS, 2015), koristile su se izračunate varijance iz MTDFREML kao početne vrijednosti parametara varijance (engl. PARMS values). Važnost primjene SAS 9.4 (SAS, 2015)u ovim analizama očituje se u boljoj vizualizaciji i obradi rezultata.

Korekcije standardnih grešaka izračunatih komponenata varijanci i heritabiliteta su izračunate prema poglavlju 13. “Functions of variance components“ korisničkog vodiča programa ASReml (Gilmour i sur., 2009) koristeći SAS 9.4 (SAS, 2015).

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Kvantiteta i čistoća ekstrahirane DNA

Deskriptivna statistika izmjerene koncentracije i čistoće ekstrahirane DNA iz tri različita materijala 109 uzorkovanih holstein goveda prikazana je u Tablici 8. Veća srednja vrijednost koncentracije DNA uočena je kod uzoraka dlake (408,86 ng/µl) kao i najveći raspon od 89,00 do 716,00 ng/µl. Unatoč većim koncentracijama nego kod mlijeka, prosjek omjera A260/A280 veći je od 2 i ukazuje na RNA kontaminaciju kod DNA ekstrahirane iz dlake. Kvaliteta (integritet) ekstrahirane DNA prikazana gel elektroforezom u prilogu na Slici 19, jasno ukazuje na veću degradiranost DNA uzoraka ekstrahiranih iz dlake (uzorci od CCHF174 do CCHF219, uzorak CCHF217 je DNA ekstrahirana iz mlijeka). Deskriptivna statistika za uzorak tkiva nije usporediva jer se radi samo o jednom uzorku. Od 87 uzoraka DNA ekstrahiranih iz mlijeka, 69 uzoraka zadovoljava preporučenu kvantitetu od 1 µg kvalitetne DNA (koncentracija >= 20 ng/µl, omjer 260/280 1,8-2,0) prema protokolu "Illumina Library Construction Services - Sample Requirements" (UCDavis, 2018). Uzorci DNA iz dlake zadovoljavaju uvjete koncentracije dok je čistoća nešto veća od 2. Bez obzira na odstupanje koncentracije i čistoće DNA mlijeka i dlake od preporučene, biblioteke 109 uzoraka holstein goveda su pripremljene te im je uspješno određen nukleotidni slijed.

Tablica 8. Deskriptivna statistika ekstrahirane DNA iz različitog materijala 109 uzorkovanih holstein goveda.

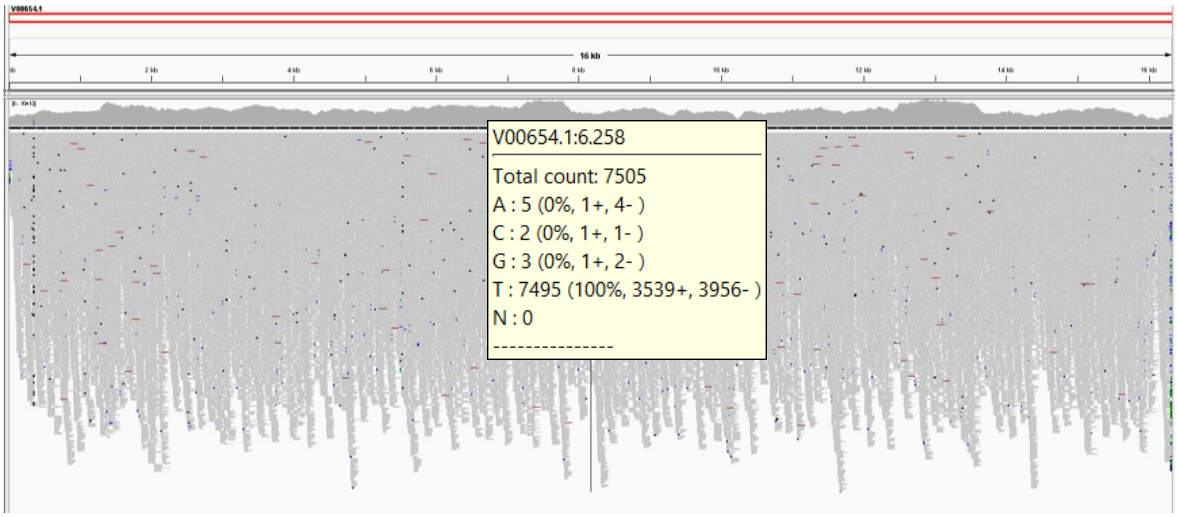
		Koncentracija DNA (ng/µl)			**Čistoća DNA 260/280 (nm)**		
Materijal	**N**	**Prosjek**	**Raspon**	**SE**	**Prosjek**	**Raspon**	**SE**
Mlijeko	87	73.88	4.50-260.00	6.10	1.87	1.34-2.80	0.02
Dlaka	21	408.86	89.00-716.00	39.98	2.08	2.04-2.09	0.002
Tkivo	1	33.00	/	/	1.94	/	/

SE – standradna greška.

4.2. Kvaliteta nukleotidnih sljedova

Prosječna dubina pokrivenosti nukleotida (engl. depth of coverage) zasebno svakog od 109 analiziranih mitogenoma holstein goveda ove disertaciji i 13 mitogenoma dobivenih analizom iz cijelih genoma holstein goveda dostupnih u banci gena – NCBI (engl. GenBank) (Clark i sur., 2015) prikazana je u Tablici 9. Prosječna dubina pokrivenosti nukleotida 109 analiziranih mitogenoma holstein goveda je 6.170,13 dok je prosječna dubina pokrivenosti 13 mitogenoma iz banke gena 1.248,19.

Duljina pokrivenosti (engl. breadth of coverage) svih spomenutih mitogenoma holstein goveda je 100%. Drugim riječima, sve pozicije analiziranih mitogenoma u odnosu na referenti mitogenom V00654 (Anderson i sur., 1982) duljine 16.338 bp, na temelju kojeg su poravnani/mapirani odsječci analiziranih nukleotidnih sljedova holstein goveda, pokriveni su u prosjeku sa 6.170,13 odnosno s 1.248,19 očitanih nukleotida.



Slika 17. Primjer vizualizacije dubine i duljine pokrivenosti mitogenoma holstein goveda korištenjem programa IGV - Integrative Genomics Viewer (Robinson i sur., 2011). Kao primjer na slici je vidljivo da je pozicija baznog para 6258 pokrivena s ukupno 7505 očitanih nukleotida.

Tablica 9. Prosječna dubina pokrivenosti nukleotida mitogenoma analiziranih holstein goveda.

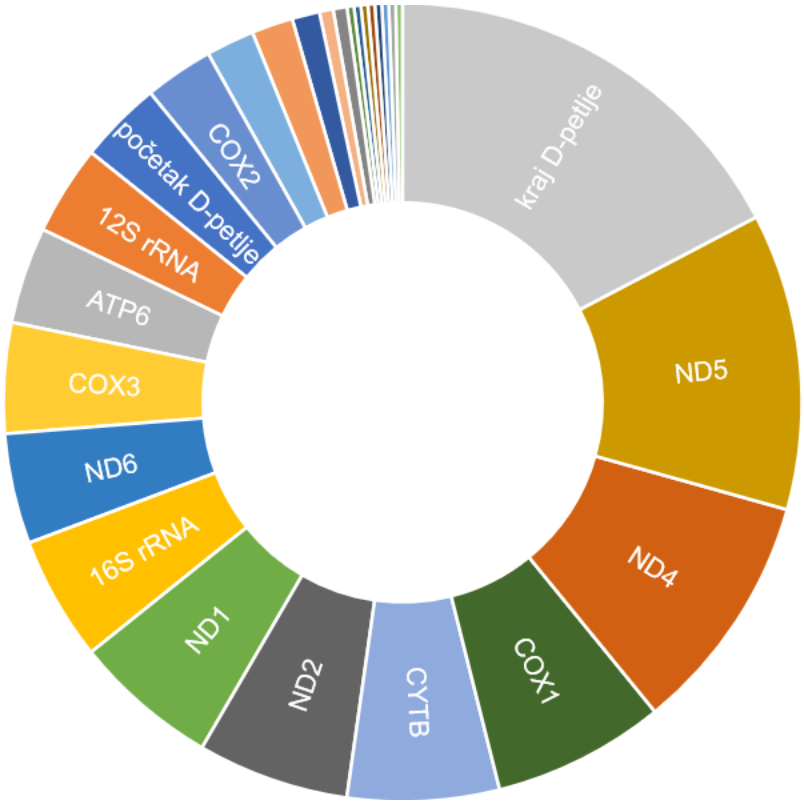
Lab_ID	Dubina pokrivenosti	Lab_ID	Dubina pokrivenosti	Lab_ID	Dubina pokrivenosti	Lab_ID	Dubina pokrivenosti
CCHF_01	13.864,66	CCHF_61	10.881,08	CCHF_134	2.679,33	CCHF_202	1.913,12
CCHF_02	12.953,90	CCHF_63	10.604,27	CCHF_136	1.960,85	CCHF_204	1.771,41
CCHF_03	12.846,04	CCHF_65	11.300,99	CCHF_138	2.209,09	CCHF_205	1.818,83
CCHF_05	10.442,13	CCHF_66	11.550,97	CCHF_143	2.738,53	CCHF_206	1.679,47
CCHF_07	12.411,67	CCHF_68	10.658,86	CCHF_144	3.006,14	CCHF_207	1.860,69
CCHF_10	10.103,29	CCHF_69	10.544,05	CCHF_145	2.590,66	CCHF_212	1.698,03
CCHF_11	11.071,83	CCHF_70	11.010,80	CCHF_146	2.942,28	CCHF_217	1.830,81
CCHF_12	10.678,61	CCHF_71	11.055,22	CCHF_151	2.680,35	CCHF_219	1.659,20
CCHF_14	99.36,38	CCHF_73	9.638,94	CCHF_152	2.785,24	**SRR934414**	1.418,88
CCHF_15	11.678,28	CCHF_74	10.886,71	CCHF_154	2.330,73	**SRR934413**	1.326,89
CCHF_16	10.245,21	CCHF_76	11.321,02	CCHF_155	2.140,34	**SRR934412**	1.011,87
CCHF_17	10.227,32	CCHF_78	11.719,89	CCHF_156	3.167,59	**SRR934411**	1.186,53
CCHF_18	10.323,21	CCHF_79	2.279,214	CCHF_159	2.735,09	**SRR934410**	1.440,88
CCHF_27	11.500,39	CCHF_81	2.364,324	CCHF_161	2.890,68	**SRR934409**	1.069,48
CCHF_28	9.973,92	CCHF_85	2.666,282	CCHF_162	3.290,60	**SRR934408**	933,84
CCHF_29	13.730,10	CCHF_86	2.571,203	CCHF_163	3.070,21	**SRR934407**	1.509,35
CCHF_30	10.032,40	CCHF_90	2.540,62	CCHF_165	3.345,46	**SRR934406**	1.223,94
CCHF_32	10.804,91	CCHF_91	2.443,677	CCHF_167	2.791,59	**SRR934405**	830,26
CCHF_33	10.821,99	CCHF_92	2.664,051	CCHF_169	3.029,04	**SRR1348592**	1.270,45
CCHF_35	12.298,56	CCHF_93	2.915,076	CCHF_173	2.808,53	**SRR1346386**	758,51
CCHF_36	10.975,01	CCHF_95	2.572,844	CCHF_174	2.836,41	**SRR1365147**	2.245,56
CCHF_37	12.741,20	CCHF_95	2.572,844	CCHF_176	3.224,85		
CCHF_38	11.371,10	CCHF_97	2.604,681	CCHF_177	2.997,62		
CCHF_39	9.317,97	CCHF_99	2.956,364	CCHF_180	3.642,57		
CCHF_40	10.734,24	CCHF_101	3.077,361	CCHF_182	2.692,76		
CCHF_41	11.366,49	CCHF_105	2.650,967	CCHF_185	2.856,25		
CCHF_42	10.032,40	CCHF_107	2.915,491	CCHF_187	2.848,42		
CCHF_43	12.834,61	CCHF_109	2.844,13	CCHF_188	1.592,40		
CCHF_44	11.680,85	CCHF_110	3.338,424	CCHF_189	1.888,96		
CCHF_46	7.959,48	CCHF_111	2.409,74	CCHF_192	2.154,79		
CCHF_50	12.900,13	CCHF_113	2.774,809	CCHF_194	1.927,02		
CCHF_52	13.389,49	CCHF_118	2.652,632	CCHF_197	2.035,24		
CCHF_54	10.320,40	CCHF_128	2.838,925	CCHF_199	1.816,84		
CCHF_55	9.759,25	CCHF_133	2.482,809	CCHF_200	1.542,62		

* podebljani mitogenomi su dobiveni analizom iz cijelih genoma holstein pasmine goveda dostupnih u banci gena – NCBI (engl. GenBank) (Clark i sur., 2015) pod navedenim pristupnim brojem. Duljina pokrivenosti svih mitogenoma holstein goveda je 100%.

4.3. Genetska varijabilnost mitogenoma

4.3.1. Haplotipovi mitogenoma

Varijabilnost polimorfizama mitogenoma u 109 nukleotidnih sljedova holstein goveda dužine 16.345 bp je izrazito visoka jer je konstruirano 96 haplotipova (Tablica 17, kolona oznake “H“) te zasebno još jedan haplotip koji se odnosi na referentni nukleotidni slijed goveda, V00654 (Anderson i sur., 1982). Dužina pojedinog dijela mitogenoma kao i pozicija na mitogenomu, uključujući broj varijabilnih mjesta (V), parsimonijski informativnih mjesta (engl. parsimony informative sites)(Pi) i singleton mjesta (S), na temelju kojih je dobiveno 96 haplotipova, prikazani su u Tablici 10. Tri najvarijabilnija dijela mitogenoma, koja imaju više od 30 varijabilnih mjesta su kraj D-petlje s 62, ND5 s 43 i ND4 s 35 varijabilnih mjesta. Dijelovi mitogenoma od 65 do 10 varijabilnih mjesta prikazani su na grafikonu 1. u smjeru kazaljke na satu (veličina segmenta mitogenoma odgovara frekvenciji varijabilnih mjesta). Dijelovi mitogenoma kod koji nije uočeno ni jedno varijabilno mjestu su L-strand i 12 tRNA aminokiselina (Phe- Fenilalanin, Ile-Izoleucin, Trp-Triptofan, Ala-Alanin, Tyr-Tirozin, Ser-Serin, Asp-Aspartat, Lys-Lizin, Gly-Glicin, His-Histidin , Leu-Leucin , Pro-Prolin).



Grafikon 1. Dijelovi mitogenoma koji imaju od 65 do 10 varijabilnih mjesta.

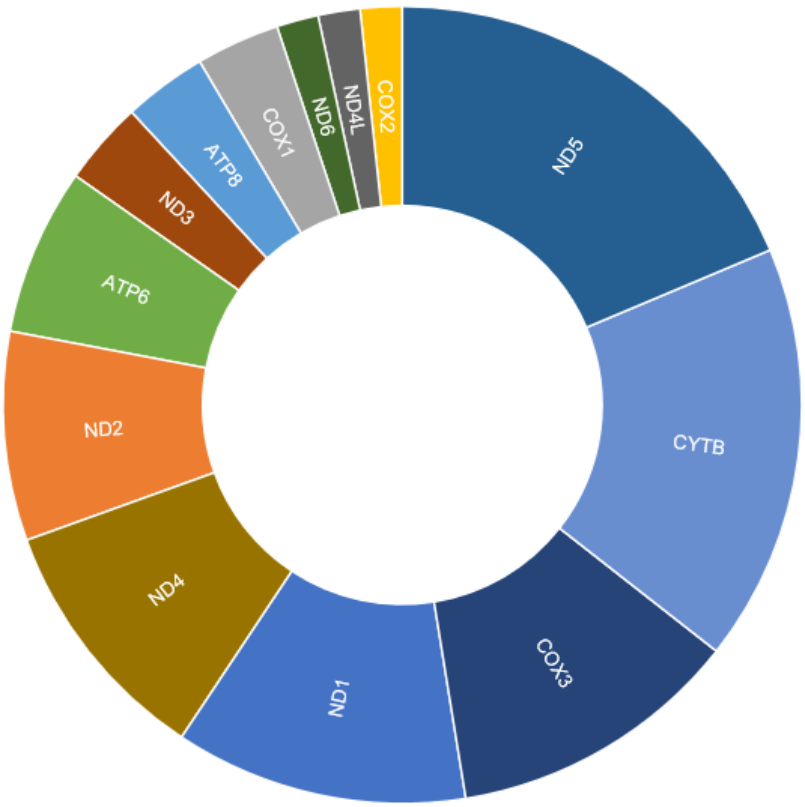
Tablica 10. Dužina pojedinog dijela mitogenoma, broj varijabilnih mjesta, parsimonijskih informativnih mjesta i singleton mjesta.

Dio mitogenoma	V	Pi	S	Dužina bp	Pozicija bp	Motiv početne-završne pozicije
početak D-petlje	12	7	5	364	1-364	ACTAATGGCT - CCCCCCCCCC
tRNA-Phe	-	-	-	67	365-431	GTTGATGTAG - TCCATAAACA
12S rRNA	13	4	9	957	432-1.388	CATAGGTTTG - TTGGATAAAT
tRNA-Val	1	-	1	67	1.389-1.455	CAAGATATAG - AATATCTTGA
16S rRNA	18	5	13	1.571	1.455-3.026	ACTAGACCTA - ACAGGGCTTA
tRNA-Leu	1	-	1	75	3.027-3.101	GTTAAGGTGG - CTCCTTAACA
ND1	21	4	17	957	3.104-4.060	ATGTTCATAA - ACAAACATAA
tRNA-Ile	-	-	-	69	4.060-4.128	AGAAATATGT - CTTATTTCTA
tRNA-Gln	1	-	1	72	4.126-4.197	CTAGAACTAT - CCAAATTCTA
tRNA-Met	1	-	1	69	4.200-4.268	AGTAAGGTCA - TCCCGTACTA
ND2	22	7	15	1.044	4.269-5.312	ATAAACCCAA - GTTAGAATAG
tRNA-Trp	-	-	-	67	5.311-5.377	AGGAATTTAG - TTAATTCCTG
tRNA-Ala	-	-	-	69	5.379-5.447	TAAGGATTGC - CTAAATCCTC
tRNA-Asn	1	-	1	73	5.449-5.521	CTAGACTGGT - CTTCAATCTA
L-strand	-	-	-	33	5.522-5.554	CTTCTCCCGC - AAGGCGGGAG
tRNA-Cys	1	1	-	67	5.555-5.621	AAGCCCCGGC - CCACAGGGCT
tRNA-Tyr	-	-	-	68	5.622-5.689	TGGTAAAAAG - CCATTTTACC
COX1	25	7	18	1.545	5.691-7.235	ATGTTCATTA - CCTAAAATAA
tRNA-Ser	-	-	-	73	7.233-7.305	TAAGAAAGGA - TCTCTCTCAA
tRNA-Asp	-	-	-	68	7.311-7.378	GAGGTGTTAG - GTACACCTCA
COX2	10	3	7	684	7.380-8.063	ATGGCATATC - AATATTATAA
tRNA-Lys	-	-	-	67	8.067-8.133	CACTAAGAAG - TCCTTGGTGA
ATP8	6	1	5	201	8.135-8.335	ATGCCGCAAC - ACCCCTGTAA
ATP6	14	5	9	681	8.296-8.976	ATGAACGAAA - CAACACATAA
COX3	16	5	11	804	8.976-9.779	ATGACACACC - TATTAACTAG
tRNA-Gly	-	-	-	69	9.760-9.828	ATTCTTTTAG - AAAAAGAATA
ND3	7	1	6	357	9.829-10.185	ATAAATTTAA - TGGTACTTAG
tRNA-Arg	1	-	1	69	10.176-10.244	TGGTACTTAG - TAATTACCAA
ND4L	4	3	1	297	10.245-10.541	ATGTCTATAG - CCAATGCTAA
ND4	35	7	28	1.425	10.535-11.959	ATGCTAAAAT - TAACAATAGA
tRNA-His	-	-	-	70	11.913-11.982	GTAAATATAG - CTTATTTACC
tRNA-Ser	2	1	1	60	11.983-12.042	GAAAAAGTAT - GGCTTTTTCG
tRNA-Leu	-	-	-	75	12.044-12.114	ACTTTTAAAG - AATAAAAGTA
ND5	43	8	35	1.821	12.115-13.935	ATAAACATAT - CCACGAGTAA
ND6	16	5	11	528	13.919-14.446	TTAATTTCCA - ATAGTATCAT
tRNA-Glu	1	-	1	69	14.447-14.515	TATTCTTACA - CTACAAGAAC
CYTB	22	4	18	1.140	14.520-15.659	ATGACTAACA - AAAATGAAGA
tRNA-Thr	2	-	2	70	15.663-15.732	GTCTTTGTAG - CCCTAAGACT
tRNA-Pro	-	-	-	66	15.732-15.797	TCAAGGAAGA - CTATTCCCTG
kraj D-petlje	62	31	31	548	15.798-16.345	AACACTATTA - ATCTCGATGG
∑	**358**	**109**	**249**	**16.476 *16.345**		

V – varijabilna mjesta, Pi – parsimonijska informativna mjesta, S – singleton mjesta; *16.345 bp je dužina seta analiziranih mitogenoma gdje nisu uključeni dijelovi preklapanja pojedinih dijelova mitogenoma.

4.3.2. Haplotipovi aminokiselina

Za konstrukciju 48 aminokiselinskih haplotipova (Tablica 17, kolona oznake “AH“) korišten je slijed od 3.828 aminokiselina (translatiranih 11.484 bp nukleinskog slijeda) koji obuhvaćaju 13 protein kodirajućih regija mitogenoma s ukupno 59 varijabilnih mjesta (Tablica 11). Dužine protein kodirajućih regija, pozicija na mitogenomu, uključujući broj varijabilnih mjesta (V), parsimonijski informativnih mjesta (Pi) i singleton mjesta (S) također su prikazani u Tablici 11. Najvarijabilnije protein kodirajuće regije (u smjeru kazaljke na satu) su ND5 s 11 i CYTB s 10 varijabilnih mjesta, a zatim slijede regije s manje od 10 varijabilnih mjesta (Grafikon 2.) (veličina segmenta mitogenoma odgovara frekvenciji varijabilnih mjesta).



Grafikon 2. Protein kodirajuće regije mitogenoma koje imaju od 11 do 1 varijabilnih mjesta.

Tablica 11. Dijelovi mitogenoma korišteni za konstrukciju aminokiselinskih haplotipova.

Dio mitogenoma	V	Pi	S	Dužina aminokisel. slijeda	Dužina (bp)	Pozicija na (bp)	Motiv početne-završne pozicije
ND1	7	1	6	319	957	3.104-4.060	MFIINILILII - LTSGIPPQT*
ND2	5	2	3	348	1044	4.269-5.312	MNPIIFIIIL-TPMLSVLE*
COX1	2	1	1	515	1545	5.691-7.235	MFINRWLFST-EEPTYVNLK*
COX2	1	-	1	228	684	7.380-8.063	MAYPMQLGFQ-FEKWSASML*
ATP8	2	-	2	67	201	8.135-8.335	MPQLDTSTWL-IYLPLLLPL*
ATP6	4	1	3	227	681	8.296-8.976	MNENLFTSFI-VSLYLHDNT*
COX3	7	1	6	268	804	8.976-9.779	MTHQTHAYHM-GSYSFSIN*
ND3	2	-	2	119	357	9.829-10.185	MNLMLALLTN-GLEWTEYGT*
ND4L	1	1	-	99	297	10.245-10.541	MSIVYINIII-VQNLNLLQC*
ND4	6	1	5	475	1.425	10.535-11.959	MLKYIIPTIM-KTLDCESNN*
ND5	11	1	10	607	1821	12.115-13.935	MNMFSSLSLVT-SMILFNFHE*
ND6	1	-	1	176	528	13.919-14.446	MMLYIVFILSV-VIMEITRGN*
CYTB	10	1	9	380	1.140	14.520-15.659	MTNIRKSHPL-TIENKLLKW*
∑	**59**	**10**	**49**	**3.828**	**11.484**		

V – varijabilna mjesta, Pi – parsimonijska informativna mjesta, S – singleton mjesta.

4.3.3. Evolucijske haplogrupe

Za konstrukciju 10 evolucijskih haplogrupa (T2 = 1; T3 =8 i T5=1) (Tablica 17, kolona oznake “EV“) korištena je varijabilnost cijelog mitogenoma 109 holstein goveda kao i kod konstrukcije 96 haplotipova. Važnost ove raspodjele na 10 evolucijskih grupa, kako je spomenuto u poglavlju 4.3.2., očituje se u metodi korištenja MCMC Bayesian evolucijske analize i dodatnih 700 mitogenoma 114 različith pasmina goveda (Cubric-Curik i sur., 2017; Cubric-Curik i sur., u pripremi).

4.4. Deskriptivna statistika proizvodnih svojstava mlijeka

Deskriptivna statistika za proizvodna svojstva mlijeka 2.373 jedinke uključene u model je prikazana u Tablici 12. Prosječna količina mlijeka u prvoj laktaciji iznosila je 6.761,90 kg mlijeka dok je u drugoj i trećoj laktaciji iznosila oko 7.400 kg mlijeka. Za sve tri laktacije najveće izmjerene vrijednosti količine mlijeka dosezale su nešto ispod 12.000 kg mlijeka, a najmanje vrijednosti oko 3.000 kg. Za količinu mliječne masti prosjek prve laktacije iznosio je 258,31 kg, a druge i treće laktacije bliže 300 kg mliječne masti. Najveća izmjerena količina mliječne masti za prvu laktaciju iznosila je 500,20 kg dok je za drugu i treću laktaciju iznosila bliže 600 kg. Podaci o mliječnosti za drugu i treću laktaciju ne postoje za sve jedinke.

Tablica 12. Deskriptivna statistika za proizvodna svojstva mlijeka.

Laktacija	Varijabla (kg)	N	Prosjek	SD	Min.	Maks.
1.	mlijeko	2.373	6.761,90	1.549,01	3.022,20	11.980,20
	mliječna mast	2.373	258,31	63,22	109,00	500,20
	proteini	2.373	220,46	50,10	88,20	380,70
2.	mlijeko	1.975	7.462,48	1.841,52	3.067,70	11.960,10
	mliječna mast	1.975	288,74	78,42	102,10	597,50
	proteini	1.975	244,87	58,42	98,30	420,90
3.	mlijeko	1.332	7.497,19	1.899,16	3.103,10	11.982,30
	mliječna mast	1.332	290,77	80,65	94,10	585,90
	proteini	1.332	243,68	60,03	92,20	440,10

SD – standardna devijacija.

U model je ukupno uključeno 109 rodova određenih analizom pedigrea, 96 haplotipova mitogenoma, 48 aminokiselinskih haplotipova mitogenoma i 10 evolucijskih haplogrupa mitogenoma koji su proučavani zasebno kao slučajan utjecaja mitogenoma u modelu (Tablica 13). Jedinke 109 rodova holstein goveda pokrivaju 16 županija, prosječno 188 stada i prosječno 1.128 kombinacija interakcije stada, godine teljenja i sezone teljenja.

Tablica 13. Deskriptivna statistika za utjecaje u modelu.

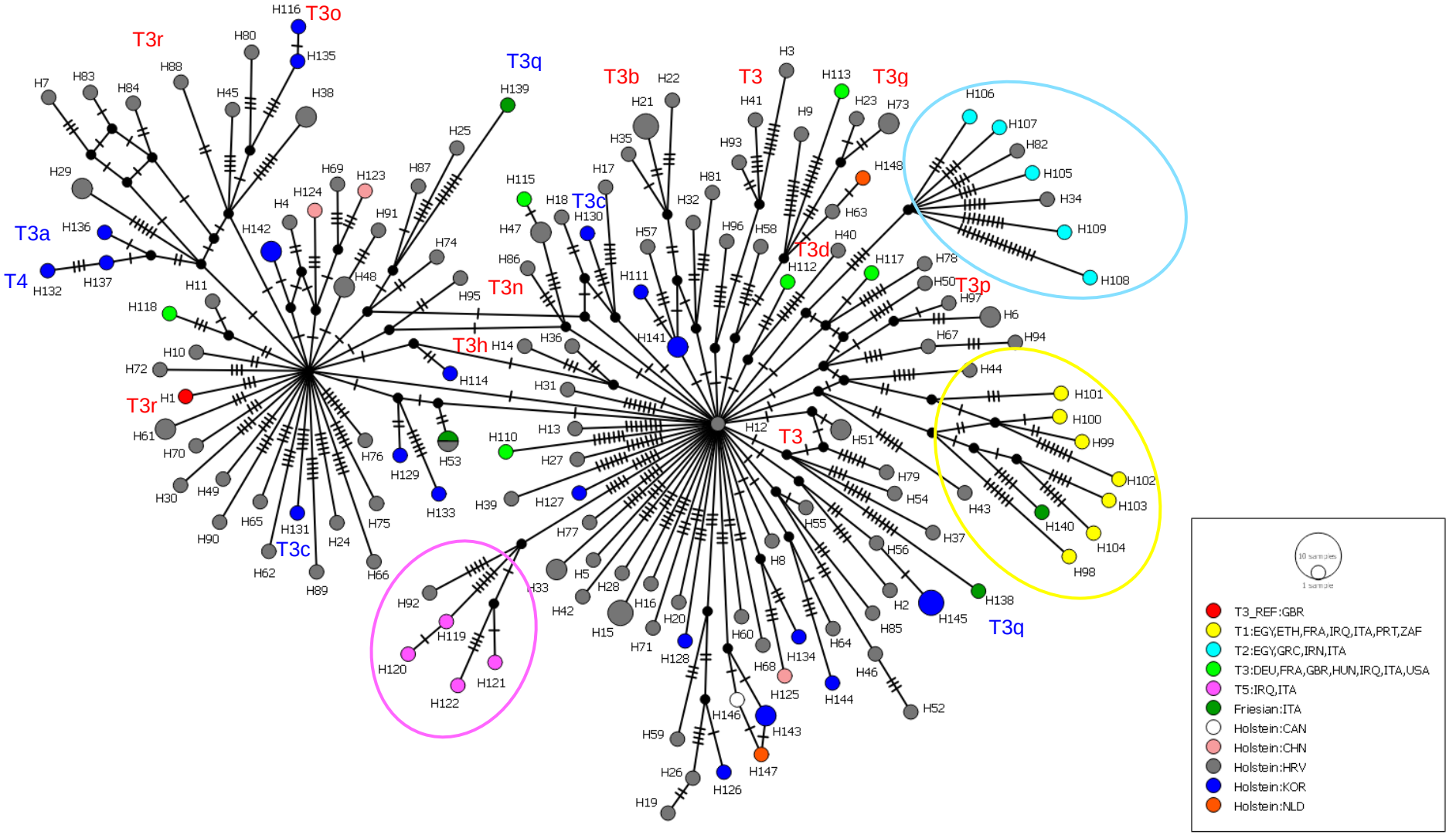
Laktacija	N	Rodovi (Cito)	Haplo	Amino	Evol	Županije	Stado	Stado/ godina/ sezona
1	2.373	109	96	48	10	16	202	1.285
2	1.975	109	96	48	10	16	191	1.195
3	1.332	109	96	48	10	16	171	904

Haplo – haplotipovi mitogenoma; Amino – aminokiselinski haplotipovi mitogenoma; Evol – evolucijske haplogrupe mitogenoma; Stado – ujedno oznaka i za farmu.

4.5. Filogenetska analiza

Filogenetska pozicija 96 haplotipova holstein goveda u odnosu na 51 haplotip (Tablica 18) prikazana je median-joining mrežom (Slika 18). Odvojeni s jednom do 20 mutacija, haplotipovi holstein goveda su grupirani unutar makro-haplogrupe T, čija divergencija nukleotidnog slijeda mitogenoma na četiri haplogrupe: T1, T2, T3 (T4 ugnježdena unutar T3) i T5, odgovara vremenu od prije ~ 16.000 godina (Achilli i sur., 2008; Achilli i sur., 2009). T haplogrupe najvjerojatnije potječu i prošle su domestikaciju (prije ~ 11.000 godina) na području Plodnog polumjeseca od kuda su se širenjem udomaćenih krda vrste *Bos taurus* proširile na područje Europe (T2, T3 i T5) i Afrike (T1) (Loftus i sur., 1994; Loftus i sur., 1999; Troy i sur., 2001; Zeder, 2008, 2009; Ajmone-Marsan i sur., 2010). Haplotipovi H43 i H44 holstein goveda oznake CCHF_78_T3 i CCHF_79_T1b, dijele isti čvor grananja (engl. median vector) zajedno s friesian govedom iz Italije i 7 referentnih haplotipova grupiranih u haplogrupu T1 (pasmine goveda iz Egipta, Etiopije, Francuske, Iraka, Italije, Portugala i Južnoafričke Republike). Udaljeni su 11 mutacija od referentnog nukleotidnog slijeda *Bos taurus* vrste (Anderson i sur., 1982). Dva haplotipa holstein goveda, H34 (jedinka CCHF_55_T2) i H82 (jedinka CCHF_185_T2), jasno su grupirana među referente haplotipove haplogrupe T2 (pasmine goveda iz Egipta, Grčke, Irana i Italije) te udaljeni 15 i 14 mutacija od referentnog nukleotidnog sljeda *Bos taurus* vrste (Anderson i sur., 1982). 92 haplotipa holstein goveda grupirana su među referentnim haplotipovima haplogrupe T3 (pasmine goveda iz Njemačke, Francuske, Ujedinjenog Kraljevstva, Mađarske, Iraka, Italije i Sjedinjenih Američkih Država) i to u 9 podhaplogrupa (T3, T3b, T3d, T3g, T3h, T3n, T3o, T3p i T3r) označene s crvenim slovima na Slici 18. Jasno se vide dva centra, podhaplogrupe T3 i T3r, koje su najfrekventnije te obuhvaćaju 49 i 35 haplotipova. Ostale T3 podhaplogrupe međusobno su udaljene jedna od druge jednu do 16 mutacija. Osim holstein goveda iz Hrvatske, u spomenute T3 podhaplogrupe su se svrstali i haplotipovi holstein goveda iz Kanade, Kine, Južne Koreje i Nizozemske te haplotpovi friesian pasmine iz Italije čineći još tri dodatne podhlaplogrupe (T3a, T3c i T3q) i haplogrupu

T4. Zanimljivo je da haplotip H53 dijele holstain govedo iz Hrvatske i friesian govedo iz Italije što ukazuje na isti mitogenom. Haplotip H92 (jedinka CCHF_205_T5) je grupiran zajedno sa četiri haplotipa specifičnih za T5 haplogrupu (pasmine goveda iz Iraka i Italije) te je udaljen 14 mutacija od referentnog nukleotidnog sljeda vrste *Bos taurus* (Anderson i sur., 1982). Kada se prema Tablici 17 u prilogu 109 mitogenoma rodova/utemeljitelja dodijeli na ukupno 2373 jedinke holstein goveda s proizvodnim mliječnim svojstvima, 18 jedinki pripada haplotipu koji je klasificiran kao haplogrupa T1; 12 i 18 jedinki pripadaju dvama haplotipovima koji se nalaze u haplogrupi T2; 26 jedinki pripada haplotipu koji je klasificiran kao haplogrupa T5. Ostalih 2.299 holstein jedinki s proizvodnim mliječnim svojstvima pripisuju se u 92 haplotipa koji su klasificirani u haplogrupu T3. Pripadnost većine holstein goveda haplogrupi T3 je u skladu s većinom pasmina Europe.


T3o
T3r
T3q
T3b
T3
T3g
T3a
T4
T3c
T3n
T3d
T3p
T3h
T3r
T3
T3c
T3q
T3_REF:GBR
T1:EGY,ETH,FRA,IRQ,ITA,PRT,ZAF
T2:EGY,GRC,IRN,ITA
T3:DEU,FRA,GBR,HUN,IRQ,ITA,USA
T5:IRQ,ITA
Friesian:ITA
Holstein:CAN
Holstein:CHN
Holstein:HRV
Holstein:KOR
Holstein:NLD

Slika 18. Median-joining mreža filogenetskog odnosa haplotipova pronađenih u holstein goveda u odnosu na haplotipove pronađene u drugim domaćim pasminama goveda. Median-joining mreža je konstruirana na temelju 148 haplotipova koji su dobiveni iz 502 varijabilna mjesta seta cijelog mitogenoma od 167 nukleotidnih sljedova duljine 16.352 bp. Krugovi su proporcionalni frekvenciji haplotipova. Crvena boja označava referentni haplotip za vrstu *Bos taurus (Anderson i sur., 1982)*, žuta označava haplotipove T1 haplogrupe, svijetlo plava haplotipove T2 haplogrupe, svijetlo zelena haplotipove T3 haplogrupe, a roza haplotipove T5 haplogrupe. Haplotipovi holstein goveda iz Kanade označeni su bijelom bojom, iz Kine svijetlo crvenom, iz Hrvatske sivom, iz Južne Koreje tamno plavom i Nizozemske narančastom bojom. Haplotiovi friesian pasmine goveda označeni su tamno zelenom bojom. Okomite crte označavaju broj mutacija između haplotipova. Detaljne informacije o pripadnosti pojedine jedinke određenom haplotipu se mogu pronaći u prilogu u Tablica 18.

4.6. Citoplazmatski utjecaj i utjecaj haplotipova mitogenoma

4.6.1. Količina mlijeka

Procijenjena proporcija fenotipske varijance na količinu mlijeka objašnjena s citoplazmatskim utjecajem roda (m^2_{rod}) i utjecajem haplotipa mitogenoma (m^2_{hap}) u prvoj, drugoj i trećoj laktaciji iznosi 7% (Tablica 14). Utjecaj aminokiselinskog haplotipa mitogenoma ($m^2_{aminohap}$) na ukupnu fenotipsku varijancu je 9% u prvoj i drugoj laktaciji te 10% u trećoj laktaciji. Spomenuti utjecaji m^2_{rod}, m^2_{hap} i $m^2_{aminohap}$ za količinu mlijeka su značajni ($p<0.01$). Utjecaj evolucijske haplogrupe mitogenoma (m^2_{evohap}) na ukupnu fenotipsku varijancu iznosi od 0,4% do 2% za sve tri laktacije, međutim nije značajan ($P>0,05$). Prema Akkaike informacijskom kriteriju, prilagođenom za veličinu uzorka (ΔAICc), model sa slučajnim utjecajem haplotipova mitogenoma (HAPLO-MODEL) pokazao se najboljim. Procijenjeni heritabiliteti za svojstvo količine mlijeka prve laktacije, u sva četiri modela (CITO, HAPLO i AMINO i EVOL), iznosili su od 0,39 do 0,51. Procijenjeni heritabiliteti u drugoj i trećoj laktaciji bili su manji, od 0,28 do 0,39 i od 0,31 do 0,40. Utjecaj interakcije stado-godina-sezona kao zajedničke okoline objasnio je od 15% do 16% fenotipske varijance u sva četiri modela u prvoj laktaciji, od 18% do 20% u drugoj laktaciji i od 25% do 27% u trećoj laktaciji. Omjer varijance za utjecaj stalne okoline objasnio je od 32% do 45% fenotipske varijance u sve tri laktacije.

Tablica 14. Komponente varijance (±SE) za količinu mlijeka (kg).

Lak.	Model	V_A	h^2	V_C	c^2	V_M	"Mito-efekt^2"	V_{pe}	p^2	∆AICc
1.	CITO	0,828	0,388±0,039	0,325	0,152±0,024	0,155	**0,073±0,020****	0,821	0,385±0,034	26,9
	HAPLO	0,860	0,402±0,039	0,323	0,151±0,024	0,151	**0,070±0,020****	0,807	0,377±0,034	**0,0**[1]
	AMINO	0,939	0,418±0,038	0,334	0,149±0,023	0,199	**0,089±0,030****	0,773	0,344±0,033	35,1
	EVOL	1,113	0,511±0,036	0,353	0,163±0,024	0,009	0,004±0,005	0,689	0,319±0,032	54,2
2.	CITO	0,865	0,282±0,042	0,585	0,191±0,029	0,227	**0,074±0,020****	1,392	0,454±0,038	0,2
	HAPLO	0,888	0,288±0,041	0,583	0,189±0,029	0,229	**0,074±0,021****	1,383	0,449±0,038	**0,0**[2]
	AMINO	1,000	0,310±0,039	0,593	0,184±0,028	0,293	**0,091±0,030****	1,337	0,415±0,036	1,4
	EVOL	1,232	0,396±0,039	0,649	0,208±0,030	0,017	0,005±0,006	1,214	0,390±0,035	24,1
3.	CITO	1,006	0,309±0,055	0,839	0,257±0,040	0,213	**0,065±0,023****	1,203	0,369±0,047	2,4
	HAPLO	1,009	0,308±0,054	0,836	0,256±0,039	0,227	**0,069±0,024****	1,199	0,366±0,047	**0,0**[3]
	AMINO	1,095	0,317±0,052	0,855	0,247±0,038	0,352	**0,102±0,038****	1,154	0,334±0,045	0,2
	EVOL	1,343	0,402±0,051	0,917	0,274±0,039	0,067	0,020±0,020	1,015	0,304±0,044	11,0

CITO - citoplazmatski model s rodovima dobivenim iz pedigrea; HAPLO - model haplotipova mitogenoma; AMINO - model aminokiselinskih haplotipova mitogenoma; EVOL - model evolucijskih haplogrupa na temelju MCMC Bayesian filogenetske analize; Heritabilitet – h^2; "Mito-efekt" – m^2_{rod}, m^2_{hap}, $m^2_{aminohap}$, m^2_{evohap}; stado/godina/sezona – c^2; stalna okolina – p^2; V_A, V_M, V_C, V_{pe} – varijance – aditivna, mitogenoma, stada/godine/sezone i stalne okoline; [1]AICc=8.095,0; [2]AICc=7.554,4; [3]AICc=5.162,8; Razina značajnosti: ** p<0.01

4.6.2. Količina mliječne masti

Za razliku od količine mlijeka procijenjena proporcija fenotipske varijance na količinu mliječne masti objašnjena s m^2_{rod}, m^2_{hap} i $m^2_{aminohap}$ manja je za 2% do 3%, te u prvoj laktaciji iznosi 5% (Tablica 15). U drugoj laktaciji 6% ukupne fenotipske varijance objašnjeno je s m^2_{rod} i m^2_{hap}, a 7% s $m^2_{aminohap}$ što je za 2% manje nego procjena fenotipske varijance za količinu mlijeka. U trećoj laktaciji proporcija fenotipske varijance na količinu mliječne masti objašnjena s m^2_{rod} i m^2_{hap} iznosi 8%, a za $m^2_{aminohap}$ 7%. Ovdje je proporcija fenotipskih varijanci objašnjena s m^2_{rod} i m^2_{hap} veća za 1% od istih za količinu mlijeka. U trećoj je laktaciji $m^2_{aminohap}$ manja za količinu masti nego za količinu mlijeka kao i u prve dvije laktacije (2% do 3%). Spomenuti utjecaji m^2_{rod}, m^2_{hap} i $m^2_{aminohap}$ za količinu mliječne masti su značajni ($p<0.01$). Utjecaj evolucijske haplogrupe mitogenoma (m^2_{evohap}) na ukupnu fenotipsku varijancu iznosi od 0,2% do 1,3% za sve tri laktacije, međutim nije značajan ($P>0,05$) kao ni kod količine mlijeka. Prema ΔAICc kriteriju model sa slučajnim utjecajem aminokiselinskih haplotipova mitogenoma (AMINO-MODEL) pokazao se najboljim u prvoj i drugoj laktaciji dok se u trećoj laktaciji najboljim pokazao HAPLO-MODEL. Procijenjeni heritabiliteti za svojstvo količine mliječne masti u sve tri laktacije su sličnih vrijednosti kao i kod količine mlijeka. Najveći heritabiliteti su uočeni u prvoj laktaciji te su iznosili od 0,38 do 0,52. Utjecaj interakcije stado-godina-sezona kao zajedničke okoline objasnio je od 16% do 18% fenotipske varijance za prvu i drugu laktaciju u sva četiri modela (CITO-MODEL, HAPLO-MODEL, AMINO-MODEL, EVOL-MODEL). Najveći utjecaj fenotipske varijance objašnjen interakcijom stado-godina-sezona, od 25% do 27%, zabilježen je u trećoj laktaciji.
Omjer varijance za utjecaj stalne okoline je objasnio od 34% do 47% fenotipske varijance u sve tri laktacije.

Tablica 15. Komponente varijance (±SE) za količinu mliječne masti (kg).

Lak.	Model	V_A	h^2	V_C	c^2	V_M	"Mito-efekt^2"	V_{pe}	p^2	∆AICc
1.	CITO	1.288,07	0,349±0,042	629,61	0,171±0,026	187,81	**0,051±0,016****	1.580,96	0,429±0,037	27,0
	HAPLO	1.310,01	0,354±0,041	622,59	0,168±0,026	197,59	**0,053±0,017****	1.571,63	0,425±0,036	26,1
	AMINO	1.411,54	0,371±0,041	638,61	0,168±0,026	212,96	**0,056±0,024****	1.540,63	0,405±0,036	**0,0**^{1}
	EVOL	1.631,78	0,438±0,039	654,13	0,175±0,026	8,01	0,002±0,004	1.435,76	0,385±0,035	46,4
2.	CITO	1.740,04	0,299±0,043	958,99	0,165±0,030	363,46	**0,062±0,019****	2.776,25	0,475±0,039	29,8
	HAPLO	1.763,77	0,302±0,042	954,84	0,163±0,029	368,75	**0,063±0,020****	2762,39	0,472±0,039	30,2
	AMINO	1.951,88	0,322±0,041	980,16	0,162±0,029	434,59	**0,072±0,027****	2694,43	0,445±0,038	**0,0**^{2}
	EVOL	2.287,82	0,389±0,041	1.054,82	0,179±0,030	27,63	0,005±0,005	2.517,97	0,428±0,038	49,3
3.	CITO	1.761,19	0,282±0,061	1.418,39	0,227±0,040	471,86	**0,076±0,024****	2.589,51	0,415±0,053	3,0
	HAPLO	1.769,37	0,282±0,060	1.416,87	0,226±0,040	504,61	**0,081±0,026****	2.575,31	0,411±0,052	**0,0**^{3}
	AMINO	2.236,14	0,342±0,058	1.486,87	0,227±0,039	456,12	**0,070±0,033****	2.356,80	0,361±0,050	13,0
	EVOL	2.570,42	0,402±0,057	1.564,47	0,245±0,041	85,40	0,013±0,017	2.168,16	0,339±0,050	17,7

CITO - citoplazmatski model s rodovima dobivenim iz pedigrea; HAPLO - model haplotipova mitogenoma; AMINO - model aminokiselinskih haplotipova mitogenoma; EVOL - model evolucijskih haplogrupa na temelju MCMC Bayesian filogenetske analize; Heritabilitet – h^2; "Mito-efekt" – m^2_{rod}, m^2_{hap}, $m^2_{aminohap}$, m^2_{evohap}; stado/godina/sezona – c^2; stalna okolina – p^2; V_A, V_M, V_C, V_{pe} – varijance – aditivna, mitogenoma, stada/godine/sezone i stalne okoline; ^{1}AICc=25.732,9; ^{2}AICc=22.336,3; ^{3}AICc=15.121,1; Razina značajnosti: ** p<0.01

4.6.3. Količina proteina

Procijenjeni doprinos m^2_{rod} i m^2_{hap} na fenotipsku varijancu količine proteina iznosi 8% u prvoj laktaciji (Tablica 16), što je slično procijenjenom doprinosu m^2_{rod} i m^2_{hap} za količinu mlijeka, a veće nego za količinu mliječne masti. Procijenjeni doprinos $m^2_{aminohap}$ na ukupnu varijancu za prvu laktaciju iznosi 12% te je veći 3% nego kod količine mlijeka i 6% kod količine mliječne masti. Procijenjeni doprinos m^2_{rod}, m^2_{hap} i $m^2_{aminohap}$ na fenotipsku varijancu količine proteina u drugoj laktaciji je sličan kao i u prvoj laktaciji. U trećoj laktaciji udio fenotipske varijance objašnjen s m^2_{rod} i m^2_{hap} iznosi 10%, a s $m^2_{aminohap}$ 15%, što je veće od 3% do 5% nego za količinu mlijeka i količinu mliječne masti. Spomenuti utjecaji m^2_{rod}, m^2_{hap} i $m^2_{aminohap}$ za količinu proteina su značajni ($p<0.01$). Utjecaj evolucijske haplogrupe mitogenoma (m^2_{evohap}) na ukupnu fenotipsku varijancu iznosi od 0,4% do 4% za sve tri laktacije, međutim, nije značajan ($P>0,05$) kao ni kod količine mlijeka i količine mliječne masti. Prema ΔAICc kriteriju HAPLO-MODEL pokazao se najboljim u sve tri laktacije dok je u drugoj laktaciji podjednako dobar AMINO-MODEL. Procijenjeni heritabilitet za svojstvo količine proteina sličnih je vrijednosti kao i kod količine mlijeka, u rasponu od 0,30 do 0,52. Utjecaj interakcije stado-godina-sezona kao zajedničke okoline objasnio je od 17% do 27% fenotipske varijance u sva četiri modela za sve tri laktacije. Omjer varijance za utjecaj stalne okoline objasnio je od 29% do 41% fenotipske varijance u sve tri laktacije.

Tablica 16. Komponente varijance (±SE) za količinu proteina (kg).

Lak.	Model	V_A	h^2	V_C	c^2	V_M	"Mito-efekt^2"	V_{pe}	p^2	ΔAICc
1.	CITO	854,94	0,383±0,040	402,32	0,180±0,025	174,75	**0,078±0,020****	800,14	0,358±0,034	37,6
	HAPLO	862,27	0,385±0,039	401,19	0,179±0,025	181,17	**0,081±0,021****	797,61	0,356±0,033	**0,0**[1]
	AMINO	939,77	0,393±0,039	408,67	0,171±0,024	279,55	**0,117±0,034****	764,60	0,320±0,032	39,2
	EVOL	1.180,31	0,519±0,036	430,61	0,189±0,025	9,50	0,004±0,005	653,02	0,287±0,031	70,5
2.	CITO	1.027,20	0,325±0,042	596,58	0,189±0,029	245,83	**0,078±0,021****	1.292,34	0,409±0,037	3,3
	HAPLO	1.014,86	0,320±0,042	597,35	0,188±0,029	261,35	**0,082±0,022****	1.299,02	0,409±0,037	**0,0**[2]
	AMINO	1.114,70	0,332±0,040	604,43	0,180±0,028	379,32	**0,113±0,034****	1.260,70	0,375±0,036	0,2
	EVOL	1.417,42	0,442±0,039	662,62	0,207±0,030	20,41	0,006±0,006	1.107,99	0,345±0,035	29,7
3.	CITO	994,56	0,302±0,056	810,07	0,246±0,040	308,64	**0,094±0,026****	1,179,24	0,358±0,047	5,6
	HAPLO	927,71	0,295±0,054	812,14	0,246±0,040	334,04	**0,101±0,027****	1.183,66	0,358±0,047	**0,0**[3]
	AMINO	1.108,29	0,309±0,052	830,58	0,232±0,038	523,03	**0,146±0,044****	1.119,87	0,313±0,044	1,4
	EVOL	1.448,97	0,422±0,053	911,31	0,265±0,041	134,20	0,039±0,034	938,40	0,273±0,045	23,9

CITO - citoplazmatski model s rodovima dobivenim iz pedigrea; HAPLO - model haplotipova mitogenoma; AMINO - model aminokiselinskih haplotipova mitogenoma; EVOL - model evolucijskih haplogrupa na temelju MCMC Bayesian filogenetske analize; Heritabilitet – h^2; "Mito-efekt" – m^2_{rod}, m^2_{hap}, $m^2_{aminohap}$, m^2_{evohap}; stado/godina/sezona – c^2; stalna okolina – p^2; V_A, V_M, V_C, V_{pe} – varijance – aditivna, mitogenoma, stada/godine/sezone i stalne okoline; [1]AICc=24.438,0; [2]AICc=21.105,4; [3]AICc=14.241,5; Razina značajnosti: ** p<0.01

5. RASPRAVA

5.1. Filogenetska analiza

Filogenetska analiza holstein goveda otkrila je veliku raznolikost i neočekivano veliki broj haplotipova mitogenoma holstein goveda unutar T haplogrupe (Slika 18) (Tablica 17). Od ukupno 96 haplotipova, koji su također korišteni za kvantitativno genetske analize, 92 haplotipa klasificirana su unutar haplogrupe T3. Ta grupa ujedno predstavlja i najfrekventniju haplogrupu za europske pasmine goveda (Beja-Pereira i sur., 2006; Achilli i sur., 2009; Bollongino i sur., 2012; Olivieri i sur., 2015). Pripadnost dva haplotipa haplogrupi T2 i po jedan haplotip haplogrupama T1 i T5, ukazuje na moguća neevidentirana pretapanja krava autohtonih pasmina goveda s bikovima holstein goveda u svrhu poboljšanja mliječnosti. U prilog tome ide MCMC Bayesian evolucijska analiza[2] više od 800 mitogenoma goveda (Cubric-Curik i sur., 2017; Cubric-Curik i sur., u pripremi), koja ukazuje na identifikaciju haplotipova: i) haplogrupe T2 u pasmina: buša iz Hrvatske; dukagjini buša iz Kosova; prespa, katerini i kea rind iz Grčke; cabannina, chianina i rendena iz Italije; crnog anatolijskog goveda iz Turske; domiaty i menofi iz Egipta; iransko govedo; iračko govedo; ii) haplogrupe T1 u pasminama: buša iz Hrvatske; buša iz Makedonije; shorthorn rodopi iz Grčke; agerolese, cabannina, calvana, chianina, cinisara, marchigiana, marremana, romagnola i podolac iz Italije; alentejana i barrosa iz Portugala; domiaty i menofi iz Egipta; abigar, arsi, boran, horro, sheko iz Etipije; nguni iz Južnoafričke Republike iii) haplogrupe T5 u pasminama: slavonsko srijemski podolac iz Hrvatske; skodra buša iz Albanije; iračko govedo; piedmontese i valdostana iz Italije. Prema navedenoj analizi, ali i prema median-joining mreži (Slika 18) s dodatnim haplogrupama mitogenoma (Tablica 7) vidljivo je da su pasmine goveda koje pripadaju T1, T2 i T5 haplogrupi, zastupljenije na području jugoistočne Europe i Afrike te da su to većinom autohtone pasmine slabijih proizvodnih svojstava na kojima se selekcija slabo vršila. Važno je za napomenuti da se klasifikacija median-joining mreže s MitoToolPy (Peng i sur., 2015) klasifikacijom haplogrupa ne poklapa u potpunosti. Na primjeru holstein goveda iz Hrvatske, koji je prema MitotoolPy (Peng i sur., 2015) klasifikaciji svrstan u T1 haplogrupu (CCHF_79_T1b), analizom median joining mreže uočava se kako isti uzorak ne pripada T1 haplogrupi, kao što na primjer pripada friesian govedo iz Italije. Isto je potvrđeno spomenutom MCMC Bayesian evolucijskom analizom (Cubric-Curik i sur., 2017; Cubric-Curik i sur., u pripremi). Slična situacija je uočena za jedinku holstein goveda iz Južne Koreje (DQ124412_KOR_HoFr_T4)

[2] MCMC Bayesian filogenetska analiza[1] – provedena koristeći BEAST2 program na temelju simulacije Monte Carlo Markovljevih lanaca (MCMC)

(Tablica 7) koja je prema MitoToolpy (Peng i sur., 2015) klasifikaciji svrstana u T4 haplogrupu, a prema median-joining mreži (Slika 18) i MCMC Bayesian evolucijskoj analizi (Cubric-Curik i sur., 2017; Cubric-Curik i sur., u pripremi) svrstana u haplotipove T3 haplogrupe. Iz navedenog proizlazi da je potrebno koristiti više različitih analiza kako bi se utvrdila filogenetska klasifikacija goveda.

5.2. Procjena komponenti varijanci mliječnih svojstava

Utjecaj varijabilnosti mitogenoma na proizvodna svojstva, iako kodiraju mali broj gena, zabilježena su u brojnim vrstama domaćih životinja. U uzgoju mliječnih pasmina goveda postignut je veliki genetski napredak analizom genoma jezgre, dok je mitogenom podcijenjen i slabije istražen. Još 80-ih godina prošlog stoljeća, studije su pokazale da s obzirom na prirodu mitohondrija kao metaboličke tvornice energije, visoko energetska obilježja kao što su prinos mlijeka, masti i proteina, imaju komponentu fenotipske varijance koja se može pripisati citoplazmatskom (mitohondrijskom) nasljeđivanju (Bell i sur., 1985; Kennedy, 1986). Na populacijama holstain goveda Hrvatske do sada je provedeno istraživanje utjecaja mitogenoma na proizvodna svojstva mliječnosti, ali samo kao citoplazmatsko (mitohondrijsko) nasljeđivanja u obliku različitih rodova pedigrea (Spehar i sur., 2017). U ovoj disertaciji, utjecaj varijabilnosti mitogenoma na fenotpsku varijancu mliječnih svojstava holstein goveda je osim u obliku nasljeđivanja kroz rodove, pokazan i kao utjecaj polimorfizama mitogenoma (haplotip, aminohaplotip i evolucijske haplogrupe), koji definiraju rodove na molekularnoj osnovi prema načelu citoplazmatskog nasljeđivanja. Ujedno, ova studija spada u prva istraživanja ovakvoga tipa gdje se proučava polimorfizam cijelog mitogenoma te je od velike važnosti jer stvara temelje za daljnje analize mitogenoma u selekcijskom uzgoju goveda.

Najprije sam procijenio komponente varijanca proizvodnih svojstava na temelju citoplazmatskog utjecaja. U prve tri laktacije, utjecaj roda pokazao je značajan utjecaj na mliječna svojstva holstein goveda, objašnjavajući 7% fenotipske varijance za količinu mlijeka, od 5% do 8% za količinu mliječne masti i od 8% do 10% za količinu proteina. Rast od 1% do 2% proporcije fenotipske varijance roda po laktaciji uočen je za količinu mliječne masti i proteina. Usporedno s drugim studijama, gdje se u većini slučajeva koriste proizvodni podaci prve laktacije holstein populacija goveda, Huizinga i sur. (1986) su dobili slične vrijednosti proporcija fenotipske varijance objašnjene rodom i to 5,6% za količinu mlijeka i 10,1% za količinu masti i proteina. Slične vrijednosti su također dobili Schutz i sur. (1992) gdje je rodom objašnjeno 5,2% fenotipske varijance za količinu mlijeka i 4,1% za količinu mliječne masti. Roughsedge i sur. (1999) jedino su uspjeli procijeniti utjecaj roda

na količinu mliječne masti koji je iznosio 4% fenotipske varijance. Vrijednosti manje od 4% fenotipske varijance za utjecaj roda na proizvodna svojstva mlijeka zabilježene su u nekoliko studija. Bell i sur. (1985) su procijenili proporcije fenotipske varijanci koje su iznosili 2% za količinu mlijeka, 1,8% za količinu mliječne masti i 3,5% za postotak mliječne masti. Kennedy (1986) je u svojoj studiji koristio računalne simulacije na temelju proizvodnih podataka Bell-a i sur. (1985) te dobio skoro identične proporcije fenotipske varijance, 1,8% za količinu mlijeka i 3,2% za postotak mliječne masti. Slične proporcije na populaciji holstein goveda u Hrvatskoj dobili su Spehar i sur. (2017). Doprinos roda fenotipskoj varijanci iznosio je 3% za količinu mlijeka, količinu mliječne masti i količinu proteina te 2% za postotak mliječne masti i proteina. Također, 2% fenotipske varijance za količinu mlijeka, ali na populacijama simmental goveda, procijenili su Schnitzenlehner i Essl (1999). Bilo je i studija na holstein populacijama goveda gdje su proporcije fenotipskih svojstava objašnjene rodom iznosile oko 1% (Albuquerque i sur., 1998) te manje od 0,5% (Boettcher i Gibson, 1997) za proizvodna svojstva mlijeka holstein goveda te je zaključeno da tako male proprocije fenotipskih varijanci ne mogu imati značajan učinak na procjene uzgojnih vrijednosti.

Nastavak analize je obuhvatio procjenu utjecaja haplotipova mitogenoma na fenotipsku varijancu mliječnih svojstava goveda. Na temelju 358 varijabilnih mjesta 109 nukleotidnih sljedova (109 jedinki/rodova) konstruirano je 96 haplotipova. Prema dosadašnjim saznanjima, svaki rod je karakteriziran mitogenom specifičnih varijabilnih mjesta koji se prenosi od utemeljitelja roda preko ženskih potomaka s generacije na generaciju. Moguća je pojava rijetkih mutacija koje za posljedicu mogu dovesti do neskladnosti pedigrea i „molekularnog pedigrea“. U slučaju ove analize, 109 rodova holstein goveda definiranih analizom pedigrea pomoću Magellan softver (Ristov i sur., 2016), svrstano je u 96 haplotipova/rodova što se i poklapa s definicijom citoplazmatskog (mitohondrijskog) nasljeđivanje. Razlika od 13 jedinki koje su trebale predstavljati 13 različitih haplotipova/rodova može biti posljedica plitkog pedigrea zbog velikog broja uvezenih jedinki prema kojemu te jedinke potječu od različitog utemeljitelja roda, iako bi dublji pedigre možda pokazao suprotno. Posljedično tome, 9 haplotipova/rodova je potkrijepljeno s po dva ista nukleotidna slijeda mitogenoma, a 2 haplotipa/roda s po 3 nukleotidna slijeda mitogenoma, umjesto jedan haplotip/rod jedan mitogenom (Tablica 17; Tablica 18). Očekivano, proporcija fenotipske varijance objašnjena haplotipom mitogenoma je identična onoj objašnjenog rodom jer nije velika razlika između 109 rodova i 96 haplotipova (“molekularnih rodova“). Proporcije fenotipskih varijanci za količinu mlijeka iznosile su 7%, količinu mliječne masti 5% do 8%, a za količinu proteina od 8% do 10%. Iako su komponente varijanci sličnih proporcija za utjecaj roda i hapolotipova mitogenoma, važnost je u tome da se sada zna i molekurna varijabilnost svakog roda. Još 80-ih godina prošlog stoljeća, Brown i sur. (1989) ukazali su da za proučavanja rodova nije dovoljan

pedigre nego i molekularne analize. Za razliku od ove studije gdje je korišten nukleotidni slijed cijelog mitogenoma dužine 16.338 bp, neke studije su koristile kraće odsječke mitogenoma te proučavale njihove utjecaje kao fiksne s ciljem da li razlika u polimorfizmu značajnu utječe na količinu ili postotak proizvodnih svojstva mlijeka goveda. Brown i sur. (1989) su na temelju barem jednog restrikcijskog mjesta 4,3 kb dugog osječka mitogenoma, uspjeli razlikovati 16 od 35 rodova holstein pasmine goveda te ustvrditi da je prisustvo HpaII markera u blizini nukleotida 360, značajno povezano s nižim postotkom mliječne masti. Schutz i sur. (1994) pokazali su da supstitucija 169 baznog para regije D petlje mitogenoma razdvaja 36 rodova holstein goveda na dva, te kao fiksni utjecaj, značajno utječe na količinu i postotak mliječne masti. U istoj studiji, 16 polimorfizama D petlje, koji su razdvojili 36 rodova na 24, također pokazuju značajan utjecaj na postotak mliječne masti. U studiji Boettcher i sur. (1996a) utjecaj 11 polimorfizama mitogenoma koji kodiraju rRNA pokazao se značajnim za količinu mlijeka, količinu mliječne masti i postotak mliječne masti u holstein goveda, dok za četiri polimorfizma D petlje nije pronađen značajan utjecaj na mlijeчna svojstva. Nedavna studija Qin i sur. (2012) pokazala je značajnu povezanost između haplotipova mitogenoma konstruiranih na temelju 18 polimorfnih mjesta gena ATPaze 6/ATPaze 8 i količine mlijeka.

Također, analiza u ovoj disertaciji obuhvatile je proporciju fenotipske varijance objašnjene unikatnim aminokiselinskim haplotipovima. Cilj je bio ispitati kako haplotipovi konstruirani na temelju 13 protein kodirajućih regija doprinose fenotipskoj varijanci proizvodnih mliječnih svojstva. Valja spomenuti da ovim pristupom nije korištena ne kodirajuća kontrolna regija (D petlja), koja osim što predstavlja najvarijabilniji dio mitogenoma, prema istraživanjima spada i u regije mitogenoma gdje je najvjerojatnija pojava heteroplazmije (Li i sur., 2010; Ye i sur., 2014; Li i sur., 2015; Rensch i sur., 2016) koju je teško detektirati (kasnije opisano u poglavlju 5.4.2.). 109 rodova holstein goveda je na temelju 59 varijabilnih mjesta aminokiselinskog slijeda svrstano u 48 aminokiselinskih haplotipova. Proporcija fenotipske varijance objašnjena aminokiselinskim haplotipovima u sve tri laktacije iznosila je od 9% do 10% za količinu mlijeka što je za 2% do 3% više nego m^2_{rod} i m^2_{hap}. Za količinu mliječne masti proporcija fenotipske varijance nisu se bitno mijenjale u odnosu na CITO i HAPLO model. Najveća proporcija fenotipske varijance objašnjena aminokiselinskim haplotipovima dobivena je za količinu proteina i iznosi 12% u prvoj, 11% u drugoj i 15% u trećoj laktaciji što je iznenađujuće velika proporcija. Napomenuo bih da ove rezultate treba tumačiti s oprezom te bi se veličina utjecaja trebala ispitati i na biološkoj osnovi funkcije mitogenoma.

Uvažavajući spomenutu metodu MCMC Bayesian evolucijske analize mitogenoma, holstein goveda su grupirana unutar 10 različitih evolucijskih haplogrupa uspoređujući ih sa 700 mitogenoma 114 različitih pasmina goveda. S biološkog stajališta ovakva podjela se

čini zanimljivom jer se varijabilnost mitogenoma proučava s aspekta rekonstrukcije filogeneze i ispitivanja evolucijskih hipoteza. Međutim, kod korištenje ovakve podjele na haplogrupe kao slučajnog utjecaja mitogenoma u procjeni komponenti varijanci nisam pronašao statistički značajan utjecaj na proizvodna svojstva mlijeka. Ovakav oblik modeliranja zahtijeva interdisciplinarni pristup što predstavlja daljnji izazov u istraživanju.

5.3. Magellan 1.0 softver

MaGelLAn 1.0 softver (Ristov i sur., 2016) se pokazao kao iznimna pomoć u identifikaciji rodova i dodjeljivanju nukleotidnog slijeda mitogenoma (haplotipova) jedinkama pedigrea. Time je omogućena kvantitativno genetska analiza ove studije jer su po načelu citoplazmatskog nasljeđivanja proizvodni podaci svake jedinke povezani s polimorfizmom svakog mitogenoma. Ovakav pristup uspješno je omogućio određivanje varijabilnosti mitogenoma u holstein goveda u Hrvatskoj. Za vrijeme trajanja doktorata, modificirali smo i optimizirali funkcionalnost MaGelLAn 1.0 softver (Ristov i sur., 2016) kroz uspješnu primjenu i testiranje u studijama i) procjene varijance roda na svojstva mliječnosti holstein goveda Hrvatske (Spehar i sur., 2017) ii) utjecaja citoplazmatskog nasljeđivanja na kvalitetu sperme fleckvieh bikova (Ferenčaković i sur., 2017) iii) analize citoplazmatskog nasljeđivanja i polimorfizama D petlje mitogenoma na veličinu legla i svojstva trupa kunića (Nguyen i sur., 2018). U dogledno vrijeme planira se nadogradnja Magellan softvera koja bi omogućila vizualizaciju pedigrea i poboljšani prikaz izlaznih analiza.

5.4. Pretpostavke i ograničenja istraživanja

5.4.1. Interakcija jezgrinog i mitohondrijskog genoma

Provjera povezanosti varijabilnosti mitogenoma s fenotipskim svojstvima u pedigreu predstavlja izazove zbog poteškoća u razdvajanju utjecaja jezgrinog genoma i mitogenoma (Schork i Guo, 1993), što se očituje u različitim oblicima nasljeđivanja: majčinsko, X–spolnih kromosoma i autosomalno. Treba spomenuti da kompleksna priroda mitohondrijske biogeneze i ekspresije fenotipa mutirajuće mtDNA također otežava razvoj modela koji se mogu rutinski koristiti u uzgoju za kvantificiranje i ispitivanja hipoteza o ulozi mtDNA u izražavanja bolesti, proizvodnih i ostalih svojstava. U prilog tome ide trenutna procjena od 1.158 proteina potrebnih za funkciju mitohondrija kod sisavaca evidentiranih u ljudskom inventaru MitoCarta2.0 (Calvo i sur., 2015). Većinu tih proteina kodira jezgrina DNA, dok mtDNA kodira samo njih 13. Posljedično, mitohondriji su pod dvostrukom genetskom kontrolom i mitohondrijskih i jezgrinih gena, a samim tim i u interakciji. U statističkom modelu ove disertacije, za procjenu utjecaja mitogenoma na proizvodna svojstva mliječnosti holstein goveda, koristilo se autosomalno (aditivna matrica srodnosti) i majčinsko

nasljeđivanje (u vidu različitih haplotipova). Zanimljivo je spomenuti termin “neobjašnjeni heritabilitet“ (engl. missing heritability). Radi se o pojavi da jezgrin genom ponekad može objasniti samo mali dio nasljeđivanja za neke bolesti (Schork i Guo, 1993) ili svojstva te se kao mogućim rješenjem navodi upotreba mitogenoma, što ukazuje važnost njegove upotrebe u analizama. Kako za jedinke holstein goveda korištenih u disertaciji nije bilo dostupnih genetskih markera jezgrinog genoma (polimorfizam jednog nukleotida ili nukleotidni slijed cijelog genoma) , nije bilo moguće u potpunosti odvojiti utjecaj genoma od mitogenoma.

5.4.2. Heteroplazmija

Zdrava jedinka u većini slučajeva sadrži molekule mtDNA koje su identične, stanje poznato kao homoplazmija. Međutim, kod ljudi i životinja gdje su bolesti uzrokovane mutacijama na mitogenomu, normalne i mutirajuće mtDNA molekule uobičajeno se nalaze u jednoj stanici i koegzistiraju. Ovo stanje je poznato kao heteroplazmija (Calvo i sur., 2015). Glavni izazov korištenja tehnologije određivanja nukleotidnih sljedova druge generacije u detekciji heteroplazmije je pojava grešaka u određivanju nukleotidnih sljedova, koje mogu biti specifične za određeno mjesto i tada može doći do pristranosti s tumačenjem heteroplazmije (Rensch i sur., 2016). Kako bi se izbjegli takvi slučajevi, kriteriji za detekciju heteroplazmije bazirani na tehnologiji određivanja nukleotidnih sljedova druge generacije, razvijeni su uporabom PhiX genomskih simulacija i uspostavljanjem različitih parametara kvalitete za utvrđivanje heteroplazmatskih pozicija (Li i sur., 2010). Prilikom analize nukleotidnih sljedova mitogenoma holstein goveda nisu provedene analize utvrđivanja heteroplazmije zbog kompleksnosti analize i razloga koji leže u sljedećim činjenicama:

a) Heteroplazmiju nije bilo moguće imputirati na jedinke rodova kao što je slučaj s haplotipovima i tako uključiti u kvantitativno genetičke modele.

b) Uzorkovane holstein jedinke bile su dobrog općeg zdravstvenog stanja i nisu pokazivale znakove bolesti. U prilog tome ide istraživanje gdje je pregledom 799 mitogenoma goveda, kojem pripada više od 120 pasmina (uključujući holstein goveda iz ove disertacije), utvrđena prisutnost dviju štetnih mutacije u dvije pasmine goveda (Novosel i sur., 2019). Jedna kod hrvatske pasmine buše u ND1 (C4171A) genu, a druga kod slovenske pasmine cika u ND4L (T10663C) genu. Za njih je specifično da su patogene u čovjeka te izazivaju Leberovu hereditarnu optičku neuropatiju[3] (LHON). Kod cika je uočena egzofatalmija (izbuljenost) desnog oka,

[3] Nasljedna neuropatija vidnog živca koja uzrokuje gubitak vida. Premda je zahvaćena mtDNA čitavog tijela, prvo se očituje gubitak vida, a u 80 do 90% slučajeva zahvaćeni su muškarci.

c) koja može uzrokovati patogenezu LHON-a, dok je adspekciju buše potrebno obaviti. Etiologiju i patogenezu tih mutacija treba dalje istražiti.

d) Uzorkovani materijali obuhvaćali su mlijeko, dlaku i tkivo (uho), a nedavni rezultati (Samuels i sur., 2013; Li i sur., 2015; Naue i sur., 2015; Rensch i sur., 2016) pokazuju da je heteroplazmija zastupljenija u jetri nego u drugim materijalima uzorkovanja.

e) Kako bi se u grubo probalo eliminirati moguću heteroplazmiju koja bi se mogla pojaviti u obliku singleton varijabilnih mjesta na mitogenomu, od ukupno 358 varijabilnih mjesta, 249 singleton mjesta su odbačena i konstruirani su haplotipovi. Očekivanja su bila da će se broj haplotipova drastično smanjiti. Međutim, to se nije dogodilo. I dalje je ostala velika varijabilnost mitogenoma i to u vidu 75 haplotipova, gdje se razlika od 21 haplotip (u frekvenciji po jedan) rasporedila na 75 haplotipova, ne povećavajući frekvenciju nijednog haplotipa značajno.

f) Genomska pozicija heteroplazmije između kralježnjaka konzistentna je u studijama (Li i sur., 2010; Ye i sur., 2014; Li i sur., 2015; Rensch i sur., 2016) gdje se većina heteroplazmije događa u nekodirajućoj kontrolnoj regiji (D petlja) koja je najvarijabilniji dio mitogenoma. Ustvari, većina heteroplazmije se nalazi u ne-kodirajućim regijama ili (strukturnim) RNA genima gdje se očekuje da modifikacije jedne baze imaju manje utjecaje (Geisler i Coller, 2013). Nadalje, heteroplazmija locirana u protein-kodirajućim genima, genomskim elementima koji su visoko konzervirani (Lin i sur., 2011), gotovo su isključivo ili sinonimne mutacije (ne utječu na aminokiselinu koja se koristi u translatiranom proteinu) ili rezultiraju biokemijski sličnim aminokiselinama. Htio bih spomenuti da upravo korištenje aminokiselinskog haplotipa (konstruiranog od samo 13 protein-kodirajućih regija mitogenoma), u procijeni komponenti varijanci, eliminira mogući utjecaj heteroplazmije, koja je najčešća u području ne-kodirajuće kontrolne regije (D petlje).

Na kraju ovog poglavlja može se zaključiti da su rezultati istraživanja Rensch i sur. (2016) pokazali da detektirana mitohondrijska heteroplazmija između kralježnjaka (16 različitih vrsta kralježnjaka koja uključuje i vrstu *Bos taurus*) dijeli slične karakteristike koje su pronađene kod ljudi, ukazujući na evolucijsku dinamiku mitohondrijske heteroplazmije.

5.4.3. Spolni kromosomi

U procjeni uzgojnih vrijednosti u stočarstvu, putem “Animal“ modela kao primjera metode najbolje linearne nepristrane procjene - BLUP (engl. Best Linear Unbiased Prediction), autosomalno nasljeđivanje koristi se za provjeru aditivnog genetskog utjecaja. Međutim, postoji nekoliko dokaza da je i nasljeđivanje spolnih kromosoma, kao oblika aditivnog genetskog utjecaja, od ekonomskog značaja za pojedina svojstva. U ovom istraživanju nije odvojen utjecaj autosomalnih kromosoma od spolnih kromosoma zbog toga što je ova tematika zastupljena s rijetkim brojem radova te je potrebno napraviti linearni mješoviti model koji uključuje spolni kromosom u obliku S matrice (Fernando i Grossman, 1990). Također, korištenje spomenutog, zahtijeva poznavanje varijanci autosomalnih i spolnih kromosomskih aditivnih utjecaja. Htio bih svejedno spomenuti nekolicinu radova gdje se uočio utjecaj spolnih kromosoma. Bazirajući se na broju kromosoma kod domaćih vrsta životinja, Lush (1945) je sugerirao da nasljeđivanje spolnih kromosoma utječe na 5% genetske varijance. Jerome i sur. (1956) i Thomas i sur. (1958) pronašli su dokaz značajnih varijanci utjecaja spolnih kromosoma na tjelesnu masu ili povećanje tjelesne mase kod peradi. Također, u vrsta s nekoliko kromosoma, kao što je vinska mušica (lat. *Drosophila melanogaster*), varijanca uvjetovana nasljeđivanjem spolnih kromosoma može doprinijeti velikoj proporciji ukupne varijance za neka kvantitativna svojstva (Cowley i sur., 1986). VanRaden (1987) je sugerirao da se 5% genetske varijabilnosti mlijeka i mliječne masti kod holstein pasmine nalazi na spolnom kromosomu, dok Ali i sur. (1992) nisu pronašli nikakav utjecaj spolnih kromosoma na mliječna proizvodna svojstva iste pasmine. Ovdje valja istaknuti da nisu koristili genotipiziranje goveda što im je omogućilo korištenje više fenotipskih podataka prema pedigreu, što povećava snagu testa za detekciju utjecaja spolnih kromosoma. Desetak godina kasnije, Boettcher i sur. (2001), među kojima je i koautor VanRaden, na američkim i kanadskim populacijama holstein goveda pokazali su da varijacije gena na spolnom kromosomu nisu dovoljno velikog utjecaja da bi se lako detektirale te vjerojatno ne utječu na fenotipsku varijancu mliječnih proizvodnih svojstava. Sugerirali su da ulaganje u uzgojne programe, gdje se koriste genetski markeri za otkrivanje varijabilnosti na spolnom kromosomu, vjerojatno nije profitabilno kao uzgojni alat. Isto tako, dijele mišljenje da se istraživanje o genima spolnih kromosoma više treba usredotočiti na njihovu biološku strukturu i funkciju, nego na njihovu uporabu u uzgoju potpomognutu genetskim markerima. Nadalje, ističu da procjene uzgojnih vrijednosti temeljene na potomcima, autosomalnom nasljeđivanju i aditivnim genetskim modelima, dobro opisuju biologiju nasljeđivanja proizvodnih svojstava mlijeka. Modeli korišteni u ovoj disertaciji valjani su pod pretpostavkom da se utjecaj mitogenoma nije podudarao s utjecajem spolnih kromosomima.

5.5. Znanstveni doprinos i daljnji izazov

Trenutna saznanja o citoplazmatskim utjecajima na mliječna proizvodna svojstva uglavnom proizlaze iz manjeg broja svjetskih istraživanja koja su se zasnivala na utjecajima rodova te varijabilnosti nukleotidnog slijeda D petlje. Ovim radom se otišlo korak dalje kroz testiranje modela cijelog nukleotidnog slijeda mitogenoma, ali i univerzalnog slijeda aminokiselina te evolucijskih haplogrupa što do sada nije rađeno. Pored navedenog prikazan je efikasan sustav kojim je moguće po ekonomski prihvatljivoj cijeni provesti kvantitativno genetičku analizu utjecaja mitogenoma na proizvodna svojstva. Primijenjene analize i rezultati doprinos su poznavanju genetske arhitekture svojstava značajnih u proizvodnji mlijeka, ali i poticaj ostalim istraživačima na analizu utjecaja mitogenoma na proizvodna svojstva značajna u stočarstvu. Važno je napomenuti da mali genetski napredak može poboljšati procjenu uzgojne vrijednosti i biti od ekonomskog značaja kada se gleda na globalnoj razini.

Rad na provedenom istraživanju tijekom izrade doktorske disertacije u sklopu HRZZ projekta, "Utilisation of the whole mitogenome in cattle breeding and conservation genetics" - "MitoTAUROmics" (01.07.2014 - 30.10.2018.), smatram korisno stečenim znanjem i iskustvom koje mi omogućuje daljnja istraživanja i prilagodbu novim tehnologijama. Kao daljnji izazov namjeravam istražiti procjenu utjecaja polimorfizama jednog nukleotida mitogenoma na fenotipsku varijancu proizvodnih svojstava holstein goveda. Također, mogućim uzorkovanjem novih rodova povećati broj fenotipskih podataka te unaprijediti analize koristeći multivarijantne modele i utjecaje spolnih kromosoma. Usvajanjem analize tehnologije druge generacije određivanja nukleotidnih sljedova i prelaskom s analize mitogenoma na genom, što je predviđeno na HRZZ projektu "Primjena NGS metoda u procjeni genomske varijablinosti preživača" – “ANAGRAMS“ (01.12.2018. – 30.11.2022.) na kojem sam suradnik, moguć je i razvoj analiza u smjeru detekcije interakcije genoma i mitogenoma, ali i pojave heteroplazmije.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata o utjecaju roda i polimorfizama nukleotidnog slijeda mitogenoma na procjenu udjela fenotipske varijance mliječnih svojstava holstein goveda u Hrvatskoj moguće je donijeti sljedeće zaključke:

1. Analizom nukleotidnog slijeda mitogenoma holstein goveda dužine 16.345 bp utvrđena je visoka varijabilnost. Na temelju 358 varijabilnih mjesta, 109 rodova holstein goveda grupirano je u 96 haplotipova. Gledajući s evolucijskog stajališta, na temelju iste varijabilnosti, rodovi su grupirani unutar 10 haplogrupa. Analizom aminokiselinskog slijeda dužine 3.828 aminokiselina, na temelju 59 aminokiselinskih varijabilnih mjesta, koja su obuhvaćena s 13 protein kodirajućih regija (11.484 bp nukleinskog slijeda mitogenoma), 109 rodova je grupirano u 48 amninokiselinskih haplotipova.

2. U prve tri laktacije, utjecaji roda, haplotipova mitogenoma i haplotipova aminokiselina pokazali su značajan utjecaj na mliječna svojstva holstein goveda, objašnjavajući od 7% do 10% fenotipske varijabilnosti za količinu mlijeka, od 5% do 8% za količinu mliječne masti i od 8% do 15% za količinu proteina. Utjecaj evolucijskih haplogrupa u procjeni komponenti varijanci proizvodnih svojstava mlijeka nije se pokazao značajnim.

3. Magellan softver se pokazao iznimno korisnim alatom u provođenju kvantitativno genetskih analiza po načelu citoplazmatskog nasljeđivanja. Omogućena je brza analiza velikih pedigrea u svrhu određivanja rodova te dodjeljivanja nukleotidnih sljedova jedinkama u pedigreu. Također, tim pristupom je omogućeno ekonomski isplativije uzorkovanje.

4. Filogenetska analiza mitogenoma holstein goveda otkrila je veliku raznolikost haplotipova unutar T3 haplogrupe koja je specifična za većinu pasmina vrste *Bos taurus* na području Europe. Pripadnost manjeg broja holstein goveda haplogrupama T2 i T5, ukazuje na moguća pretapanja krava autohtonih pasmina s bikovima holstein goveda.

5. Primijenjene analize i značajan utjecaj mitogenoma na fenotipsku varijancu proizvodnih mliječnih svojstava doprinos su poznavanju genetske arhitekture svojstava u proizvodnji mlijeka i baza su za daljnje poboljšanje procjene uzgojnih vrijednosti goveda.

7. POPIS LITERATURE

Achilli A., Bonfiglio S., Olivieri A., Malusà A., Pala M., Kashani B.H., Perego U.A., Ajmone-Marsan P., Liotta L., Semino O. (2009). The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome. PLoS One 4: e5753

Achilli A., Olivieri A., Pellecchia M., Uboldi C., Colli L., Al-Zahery N., Accetturo M., Pala M., Kashani B.H., Perego U.A. (2008). Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. Curr Biol 18: R157-R8

Ajmone-Marsan P., Garcia J.F., Lenstra J.A. (2010). On the origin of cattle: how aurochs became cattle and colonized the world. Evol Anthropol 19: 148-57

Albuquerque L., Keown J.F., Van Vleck L.D. (1998). Variances of Direct Genetic Effects, Maternal Genetic Effects, and Cytoplasmic Inheritance Effects for Milk Yield, Fat Yield, and Fat Percentage1. J Dairy Sci 81: 544-9

Ali T., Schaeffer L., Gibson J., Burnside E. (1992). Usefulness of pedigree indices in predicting future transmitting abilities of sons. Canadian Journal of Animal Science 72: 409-12

Anderson S., De Bruijn M., Coulson A., Eperon I., Sanger F., Young I. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. J Mol Biol 156: 683-717

Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol 16: 37-48

Bansal V., Harismendy O., Tewhey R., Murray S.S., Schork N.J., Topol E.J., Frazer K.A. (2010). Accurate detection and genotyping of SNPs utilizing population sequencing data. Genome Res 20: 537-45

Beja-Pereira A., Caramelli D., Lalueza-Fox C., Vernesi C., Ferrand N., Casoli A., Goyache F., Royo L.J., Conti S., Lari M. (2006). The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 8113-8

Bell B.R., McDaniel B., Robison O. (1985). Effects of Cytoplasmic Inheritance on Production Traits of Dairy Cattle1. J Dairy Sci 68: 2038-51

Blankenberg D., Gordon A., Von Kuster G., Coraor N., Taylor J., Nekrutenko A., Team G. (2010). Manipulation of FASTQ data with Galaxy. Bioinformatics 26: 1783-5

Boettcher P., Freeman A., Johnston S., Smith R., Beitz D., McDaniel B. (1996a). Relationships Between Polymorphism for Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid and Yield Traits of Holstein Cows1. J Dairy Sci 79: 647-54

Boettcher P., Gibson J. (1997). Estimation of variance of maternal lineage effects among Canadian Holsteins. J Dairy Sci 80: 2167-76

Boettcher P., Jairath L., VanRaden P. (2001). Evaluation of sire predicted transmitting abilities for evidence of X-chromosomal inheritance in North American sire families. J Dairy Sci 84: 256-65

Boettcher P., Kuhn M., Freeman A. (1996). Impacts of Cytoplasmic Inheritance on Genetic Evaluations1. J Dairy Sci 79: 663-75

Boldman K. (1993). A manual for use of MTDFREML. A set of programs to obtain estimates of variances and covariances [Draft]. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service

Bollongino R., Burger J., Powell A., Mashkour M., Vigne J.-D., Thomas M.G. (2012). Modern taurine cattle descended from small number of Near-Eastern founders. Mol Biol Evol 29: 2101-4

Bonfiglio S., Ginja C., De Gaetano A., Achilli A., Olivieri A., Colli L., Tesfaye K., Agha S.H., Gama L.T., Cattonaro F. (2012). Origin and spread of Bos taurus: new clues from mitochondrial genomes belonging to haplogroup T1. PLoS One 7: e38601

Brajković V., Duvnjak I., Ferenčaković M., Špehar M., Raguž N., Lukić B., Curik I., Cubric-Curik V. (2018). The effect of DNA quality on the sequencing success of cattle. J Cent Eur Agric 19: 804-9

Brown D., Koehler C., Lindberg G., Freeman A., Mayfield J., Myers A., Schutz M., Beitz D. (1989). Molecular analysis of cytoplasmic genetic variation in Holstein cows. J Anim Sci 67: 1926-32

Bushnell B. (2016). BBMap short read aligner. University of California, Berkeley, California URL http://sourceforge net/projects/bbmap

Calvo S.E., Clauser K.R., Mootha V.K. (2015). MitoCarta2. 0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. Nucleic Acids Res 44: D1251-D7

Consorcio Argentino de Tecnología Genómica. CATG. (2014). HiSeq 1500 uređaj za određivanje slijeda nukleotida druge generacije. Izvor: http://tecnologiagenomica.org/ [Pristupljeno 1.10.2018]

Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. (2015). GenBank. Nucleic Acids Res 44: D67-D72

Cooper G.M., Hausman R.E. (2004). The cell: Molecular approach. Medicinska naklada

Cowley D.E., Atchley W.R., Rutledge J. (1986). Quantitative genetics of Drosophila melanogaster. I. Sexual dimorphism in genetic parameters for wing traits. Genetics 114: 549-66

Cubric-Curik V., Novosel D., Brajkovic V., Krebs S., Sölkner J., Salamon D., Ristov S., Berger B., Triviziaki S., Bizelis I., Ferenčaković M., Rothammer S., Kunz E., Simčič M., Dovč P., Bunevski G., Bytyqi H., Marković B., Brka M., Kume K., Stojanović S., Vasil N., Zinovieva N., Čačić M., Curik I., Medugorac I. (2017). Complete

mitogenome analysis supports multiple origin domestication hypothesis for European cattle. Book of Abstracts of the 36th International Society for Animal Genetics Conference, Dublin, 162

Cubric-Curik V., Novosel D., Brajkovic V., Rota-Stabelli O., Krebs S., Sölkner J., Salamon D., Ristov S., Berger B., Triviziaki S., Bizelis I., Ferenčaković M., Rothammer S., Kunz E., Simčič M., Dovč P., Bunevski G., Bytyqi H., Marković B., Brka M., Kume K., Stojanović S., Vasil N., Zinovieva N., Čačić M., Radović S., Miracle P., Vernesi C., Curik I., Medugorac I. (u pripremi). Large-scale maternal genomics reveals living aurochs mitochondria in Europe.

DePristo M.A., Banks E., Poplin R., Garimella K.V., Maguire J.R., Hartl C., Philippakis A.A., Del Angel G., Rivas M.A., Hanna M. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. Nat Genet 43: 491

Desler C., Marcker M.L., Singh K.K., Rasmussen L.J. (2011). The importance of mitochondrial DNA in aging and cancer. J Aging Res 2011 17: 407536

Douglas K.C., Halbert N.D., Kolenda C., Childers C., Hunter D.L., Derr J.N. (2011). Complete mitochondrial DNA sequence analysis of Bison bison and bison–cattle hybrids: Function and phylogeny. Mitochondrion 11: 166-75

Duchêne S., Archer F.I., Vilstrup J., Caballero S., Morin P.A. (2011). Mitogenome phylogenetics: the impact of using single regions and partitioning schemes on topology, substitution rate and divergence time estimation. PLoS One 6: e27138

Edwards C.J., Magee D.A., Park S.D., McGettigan P.A., Lohan A.J., Murphy A., Finlay E.K., Shapiro B., Chamberlain A.T., Richards M.B. (2010). A complete mitochondrial genome sequence from a mesolithic wild aurochs (Bos primigenius). PLoS One 5: e9255

Falconer D.S., Mackay T.F., Frankham R. (1996). Introduction to quantitative genetics (4th edn). Trends Genet 12: 280

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. (2018). Domestic Animal Diversity Information System. Izvor: http://www.fao.org/dad-is/transboundary-breed/en/ [Pristupljeno 1.10.2018.]

Ferenčaković M., Spehar M., Brajkovic V., Cubric-Curik V., Sölkner J., Curik I. (2017). The Impact of Cytoplasmic Inheritance on Sperm Quality in Fleckvieh Bulls. Agric Conspec Sci 82: 89-92

Fernández A., Alves E., Fernández A., De Pedro E., López-García M., Ovilo C., Rodríguez M., Silió L. (2008). Mitochondrial genome polymorphisms associated with longissimus muscle composition in Iberian pigs. J Anim Sci 86: 1283-90

Fernando R., Grossman M. (1990). Genetic evaluation with autosomal and X-chromosomal inheritance. Theor Appl Genet 80: 75-80

Geisler S., Coller J. (2013). RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. Nat Rev Mol Cell Biol 14: 699

Ghezzi D., Marelli C., Achilli A., Goldwurm S., Pezzoli G., Barone P., Pellecchia M.T., Stanzione P., Brusa L., Bentivoglio A.R. (2005). Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians. Europ J Hum Genet 13: 748

Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 77: 6715-9

Gilmour A., Gogel B., Cullis B., Thompson R. (2009) ASReml User Guide Release 3.0. VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, United Kingdom.

Hanford K.J., Snowder G., Van Vleck L.D. (2003). Models with nuclear, cytoplasmic, and environmental effects for production traits of Columbia sheep. J Anim Sci 81: 1926-32

Henderson C. (1984). Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph, Guelph.

Hillman-Jackson J., Clements D., Blankenberg D., Taylor J., Nekrutenko A., Team G. (2012). Using galaxy to perform large-scale interactive data analyses. Curr Protoc Bioinformatics: 10-5

Hohenboken W. (1985). Maternal effects. General and quantitative genetics: 135-49

Horsburgh K.A., Prost S., Gosling A., Stanton J.-A., Rand C., Matisoo-Smith E.A. (2013). The genetic diversity of the Nguni breed of African Cattle (Bos spp.): complete mitochondrial genomes of haplogroup T1. PLoS One 8: e71956

Hrvatska poljoprivredna agencija. HPA. (2017). Godišnje izvješće o uzgoju goveda za 2017. godinu. Izvor: https://www.hpa.hr/publikacije-godisnja-izvjesca/ [Pristupljeno 18.9.2018.]

Hrvatska poljoprivredna agencija. HPA. (2018). Stočarstvo, govedarstvo, holstein pasmina. Izvor: https://www.hpa.hr/stocarstvo-govedarstvo/ [Pristupljeno 20.9.2018.]

Huizinga H., Korver S., McDaniel B., Politiek R. (1986). Maternal effects due to cytoplasmic inheritance in dairy cattle. Influence on milk production and reproduction traits. Livest Prod Sci 15: 11-26

Hutchison C.A., Newbold J.E., Potter S.S., Edgell M.H. (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. Nature 251: 536

Illumina. (2017). An introduction to Next-Generation Sequencing Technology, SAD. Izvor: https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf [Pristupljeno 22.9.2018.]

Jacobsen M.W., Hansen M.M., Orlando L., Bekkevold D., Bernatchez L., Willerslev E., Gilbert M.T.P. (2012). Mitogenome sequencing reveals shallow evolutionary

histories and recent divergence time between morphologically and ecologically distinct European whitefish (Coregonus spp.). Mol Ecol 21: 2727-42

Jerome F.N., Henderson C., King S. (1956). Heritabilities, gene interactions, and correlations associated with certain traits in the domestic fowl. Poultry Science 35: 995-1013

Kennedy B. (1986). A further look at evidence for cytoplasmic inheritance of production traits in dairy cattle. J Dairy Sci 69: 3100-5

Koboldt D.C., Zhang Q., Larson D.E., Shen D., McLellan M.D., Lin L., Miller C.A., Mardis E.R., Ding L., Wilson R.K. (2012). VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. Genome Res *22*: 568-576

Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 33: 1870-4

Legates J. (1972). The role of maternal effects in animal breeding: IV. Maternal effects in laboratory species. J Anim Sci 35: 1294-302

Leigh J.W., Bryant D. (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods Ecol Evol 6: 1110-6

Li H., Durbin R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. Bioinformatics 25: 1754-60

Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. (2009a). The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics 25: 2078-9

Li M., Schönberg A., Schaefer M., Schroeder R., Nasidze I., Stoneking M. (2010). Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes. Am J Hum Genet 87: 237-49

Li M., Schröder R., Ni S., Madea B., Stoneking M. (2015). Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. Proc Natl Acad Sci U S A 112: 2491-6

Lin M.F., Kheradpour P., Washietl S., Parker B.J., Pedersen J.S., Kellis M. (2011). Locating protein-coding sequences under selection for additional, overlapping functions in 29 mammalian genomes. Genome Res 21: 1916-28

Lindberg G.L. (1989). Sequence heterogeneity of bovine mitochondrial DNA.

Liou C.-W., Chen J.-B., Tiao M.-M., Weng S.-W., Huang T.-L., Chuang J.-H., Chen S.-D., Chuang Y.-C., Lee W.-C., Lin T.-K. (2012). Mitochondrial DNA coding and control region variants as genetic risk factors for type 2 diabetes mellitus. Diabetes: DB_111369

Lippold S., Matzke N.J., Reissmann M., Hofreiter M. (2011). Whole mitochondrial genome sequencing of domestic horses reveals incorporation of extensive wild horse diversity during domestication. BMC Evol Biol 11: 328

Loftus R., Ertugrul O., Harba A., El-Barody M., MacHugh D., Park S., Bradley D. (1999). A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. Mol Ecol 8: 2015-22

Loftus R.T., MacHugh D.E., Bradley D.G., Sharp P.M., Cunningham P. (1994). Evidence for two independent domestications of cattle. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 2757-61

Ludwig A., Lieckfeldt D., Hesse U.G., Froelich K. (2016). Tracing the maternal roots of the domestic Red Mountain Cattle. Mitochondrial DNA Part A 27: 1080-3

Lush J. (1945). Animal Breeding Plans, 3rd. Iowa State College Press, Ames, Iowa

Mannen H., Kojima T., Oyama K., Mukai F., Ishida T., Tsuji S. (1998). Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese Black cattle. J Anim Sci 76: 36-41

McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytsky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res 20: 1297-303

Meyer K. (1989). Restricted maximum likelihood to estimate variance components for animal models with several random effects using a derivative-free algorithm. Genet Select Evol 21: 317

Mezzadra C.A., Melucci L.M., Corva P.M., López Valiente S., Rípoli M.V., Lirón P., Giovambattista G. (2005). Effects of cytoplasmic inheritance on preweaning traits of Hereford cattle. Genet Mol Biol 28: 357-62

Mitić N., Ferčej J., Zeremski D., Lazarević L. (1987). Govedarstvo. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd: 452-5

Moritz C., Dowling T., Brown W. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Annu Rev Ecol Syst 18: 269-92

Nguyen T.N., Brajkovic V., Cubric-Curik V., Ristov S., Veir Z., Szendrő Z., Nagy I., Curik I. (2018). Analysis of the impact of cytoplasmic and mitochondrial inheritance on litter size and carcass in rabbits. World Rabbit Sci 26: 287

Northcutt S., Willham R., Wilson D. (1991). Genetic parameters for nuclear and nonnuclear inheritance in three synthetic lines of beef cattle differing in mature size. J Anim Sci 69: 4745-53

Novosel D., Cubric-Curik V., Simcic M., Dovc P., Curik I. (2019). Two detrimental mutations in cattle mitogenome indicate the presence of Leber's Hereditary Optic Neuropathy. J Cent Eur Agric 20(1): 19-24

Olivieri A., Gandini F., Achilli A., Fichera A., Rizzi E., Bonfiglio S., Battaglia V., Brandini S., De Gaetano A., El-Beltagi A. (2015). Mitogenomes from Egyptian Cattle Breeds: New clues on the origin of haplogroup Q and the early spread of Bos taurus from the Near East. PLoS One 10: e0141170

Out A.A., van Minderhout I.J., Goeman J.J., Ariyurek Y., Ossowski S., Schneeberger K., Weigel D., van Galen M., Taschner P.E., Tops C.M. (2009). Deep sequencing to reveal new variants in pooled DNA samples. Hum Mutat 30: 1703-12

Peng M.S., Fan L., Shi N.N., Ning T., Yao Y.G., Murphy R.W., Wang W.Z., Zhang Y.P. (2015). DomeTree: a canonical toolkit for mitochondrial DNA analyses in domesticated animals. Mol Ecol Resour 15: 1238-42

Poulton J., Luan J.a., Macaulay V., Hennings S., Mitchell J., Wareham N.J. (2002). Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case–control study. Hum Mol Genet 11: 1581-3

Pun A., Goyache F., Cervantes I., Gutiérrez J. (2012). Cytoplasmic line effects for birth weight and preweaning growth traits in the Asturiana de los Valles beef cattle breed. Livest Sci 143: 177-83

Qin Y.-H., Chen S.-Y., Lai S.-J. (2012). Polymorphisms of mitochondrial ATPase 8/6 genes and association with milk production traits in Holstein cows. Anim Biotechnol 23: 204-12

Rensch T., Villar D., Horvath J., Odom D.T., Flicek P. (2016). Mitochondrial heteroplasmy in vertebrates using ChIP-sequencing data. Genome Biol 17: 139

Ridge P.G., Maxwell T.J., Corcoran C.D., Norton M.C., Tschanz J.T., O'Brien E., Kerber R.A., Cawthon R.M., Munger R.G., Kauwe J.S. (2012). Mitochondrial genomic analysis of late onset Alzheimer's disease reveals protective haplogroups H6A1A/H6A1B: the Cache County Study on Memory in Aging. PLoS One 7: e45134

Ristov S., Brajkovic V., Cubric-Curik V., Michieli I., Curik I. (2016). MaGelLAn 1.0: a software to facilitate quantitative and population genetic analysis of maternal inheritance by combination of molecular and pedigree information. Genet Select Evol 48: 65

Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. (2011). Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol 29: 24

Roughsedge T., Brotherstone S., Visscher P. (1999). Estimation of variance of maternal lineage effects at the Langhill dairy herd. Anim Sci 68: 79-86

Ruiz-Pesini E., Lapeña A.-C., Díez-Sánchez C., Pérez-Martos A., Montoya J., Alvarez E., Díaz M., Urriés A., Montoro L., López-Pérez M.J. (2000). Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. Am J Hum Genet 67: 682-96

Ruiz-Pesini E., Mishmar D., Brandon M., Procaccio V., Wallace D.C. (2004). Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. Science 303: 223-6

SAS (2015). Base SAS 9.4 procedures guide. SAS Institute

Schnitzenlehner S., Essl A. (1999). Field data analysis of cytoplasmic inheritance of dairy and fitness-related traits in cattle. Anim Sci 68: 459-66

Scholz M. (2018). Coverage (read or sequencing depth). Izvor: http://www.metagenomics.wiki/pdf/definition/coverage-read-depth [Pristupljeno 5.10.2018]

Schork N., Guo S. (1993). Pedigree models for complex human traits involving the mitochondrial genome. Am J Hum Genet 53: 1320

Schutz M., Freeman A., Beitz D., Mayfield J. (1992). The Importance of Maternal Lineage on Milk Yield Traits of Dairy Cattle1. J Dairy Sci 75: 1331-41

Schutz M., Freeman A., Lindberg G., Koehler C., Beitz D. (1994). The effect of mitochondrial DNA on milk production and health of dairy cattle. Livest Prod Sci 37: 283-95

Shen L., Wei J., Chen T., He J., Qu J., He X., Jiang L., Qu Y., Fang H., Chen G. (2011). Evaluating mitochondrial DNA in patients with breast cancer and benign breast disease. J Cancer Res Clin Oncol 137: 669-75

Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol 7: 539

Snowder G., Hanford K., Van Vleck L.D. (2004). Comparison of models including cytoplasmic effects for traits of Rambouillet sheep. Livest Prod Sci 90: 159-66

Spehar M., Ferenčaković M., Brajkovic V., Curik I. (2017). Variance Estimation of Maternal Lineage Effect on Milk Traits in Croatian Holstein Cattle. Agric Conspec Sci 82: 263-6

Stothard P., Liao X., Arantes A.S., De Pauw M., Coros C., Plastow G.S., Sargolzaei M., Crowley J.J., Basarab J.A., Schenkel F. (2015). A large and diverse collection of bovine genome sequences from the Canadian Cattle Genome Project. GigaScience 4: 49

Suchard M.A., Lemey P., Baele G., Ayres D.L., Drummond A.J., Rambaut A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. Virus Evolution 4: vey016

Szwaczkowski T., Bednarczyk M., Kielczewski K. (1999). Direct, maternal and cytoplasmic variance estimates of egg production traits in laying hens. J Anim Feed Sci 8: 589-98

Taylor R.W., Turnbull D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. Nat Rev Genet 6: 389

Tess M., MacNeil M. (1994). Evaluation of cytoplasmic genetic effects in Miles City Line 1 Hereford cattle. J Anim Sci 72: 851-6

Thomas C., Blow W., Cockerham C.C., Glazener E. (1958). The heritability of body weight, gain, feed consumption, and feed conversion in broilers. Poult Sci 37: 862-9

Troy C.S., MacHugh D.E., Bailey J.F., Magee D.A., Loftus R.T., Cunningham P., Chamberlain A.T., Sykes B.C., Bradley D.G. (2001). Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. Nature 410: 1088

UC Davis Genome Center. UCDavis. (2018). Illumina Library Construction Services: Sample Requirements, SAD. Izvor: http://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu/illumina-library-construction/ [Pristupljeno 9.5.2018]

Usman T., Yu Y., Liu C., Fan Z., Wang Y. (2014). Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. Genet Mol Res 13: 3319-28

Van der Auwera G.A., Carneiro M.O., Hartl C., Poplin R., Del Angel G., Levy-Moonshine A., Jordan T., Shakir K., Roazen D., Thibault J. (2013). From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. Curr Protoc Bioinformatics 43: 11-10

Van Rossum G. (2009). What's New In Python 3.0. What's New In Python 30—Python V3 01 Documentation

Van Tassell C.P., Smith T.P., Matukumalli L.K., Taylor J.F., Schnabel R.D., Lawley C.T., Haudenschild C.D., Moore S.S., Warren W.C., Sonstegard T.S. (2008). SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. Nat Methods 5: 247-52

VanRaden P. (1987). Evaluations of sires based on sons and on maternal grandsons. J Dairy Sci 70: 185

Venema D. (2014). Evolution Basics: Becoming Human, Part 1: Mitochondrial Eve and Y Chromosome Adam. Izvor: https://biologos.org/blogs/dennis-venema-letters-to-the-duchess/understanding-evolution-mitochondrial-eve-y-chromosome-adam [Pristupljeno 8.9.2018]

Wallace D., Ruiz-Pesini E., Mishmar D. (2003). mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol

Wallace D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. Science 283: 1482-8

Whittaker P.A., Danks S.M. (1978). Mitochondria: structure, function, and assembly. Addison-Wesley Longman Ltd

Woldehawariat G., Talamantes M.A., Petty Jr R.R., Cartwright T. (1977). A summary of genetic and environmental statistics for growth and conformation characters of young beef cattle. Tex Agric Exp Stn 103: 14

Ye K., Lu J., Ma F., Keinan A., Gu Z. (2014). Extensive pathogenicity of mitochondrial heteroplasmy in healthy human individuals. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 10654-9

Zeder M.A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 11597-604

Zeder M.A. (2009). The Neolithic macro-(r) evolution: macroevolutionary theory and the study of culture change. J Archaeol Res 17: 1-63

8. ŽIVOTOPIS

Vladimir Brajković rođen je 5. travnja 1989. godine. Osnovnu školu i opću gimnaziju završio je u Zagrebu. Preddiplomski studij Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2008. godine i 2011. godine stječe titulu sveučilišnog prvostupnika. Iste godine upisuje diplomski studij Genetika i oplemenjivanje životinja te 2013. godine stječe titulu magistra inženjera agronomije. Za vrijeme diplomskog studija obavlja Erasmus stručnu praksu u trajanju od 3 mjeseca, na Sveučilištu u Sassariju Italiji, na temelju koje piše diplomski rad i osvaja Dekanovu nagradu. Od 2014. do 2015. godine zaposlen je na Agronomskom fakultetu na Zavodu za opće stočarstvo kao stručni suradnik te kasnije kao pripravnik stručnog osposobljavanja. Od 2016. godine, zaposlen je kao doktorand na Agronomskom fakultetu, Zavodu za opće stočarstvo na suradničkom radnom mjestu asistenta u okviru “Projekta razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ u sklopu HRZZ projekta "Utilisation of the whole mitogenome in cattle breeding and conservation genetics" - "MitoTAUROmics". Za vrijeme doktorata bio je suradnik na Horizon 2020-TWINN projektu “MendTheGap“ – Smart Integration of Genetics with Sciences of the Past in Croatia: Minding and Mending the Gap u sklopu kojeg je sudjelovao na nekoliko radionica i ljetnih škola u svrhu usavršavanja analiza iz područja genetike i zooarheologije. Također, sudjelovao je u pisanju i trenutno je aktivan na projektu Uspostava laboratorija za arheogenetiku Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu - u okviru "Razvoj i jačanje sinergija s horizontalnim aktivnostima programa OBZOR 2020: Twinning i ERA Chairs" i HRZZ projekta "Primjena NGS metoda u procjeni genomske varijabilnosti preživača" – “ANAGRAMS“. Do sada je osvojio dvije međunarodne stipendije u okviru projekta “A collaborative European Network on Rabbit Genome Biology – RGB-Net“, koje su mu omogućile specijalizacije u analizama arheološke DNA u trajanju od pet mjeseci na Institutu Fondazione Edmund Mach, San Michele, Italiji. Kao suradnik na šest modula preddiplomskih i diplomskih studija, bio je uključen u održavanje vježbi. Sudjelovao je u izradi dva diplomska rada kao neposredni voditelj. Kao koautor, do sada je objavio ukupno četiri znanstvena rada indeksirana u a1 bazi i tri rada u a2 bazi, od čega po jedan rad u navedenim bazama kao prvi autor. Sudjelovao je na četiri međunarodne konferencije s tri usmena i jednim poster izlaganjem.

Popis objavljenih znanstvenih radova:

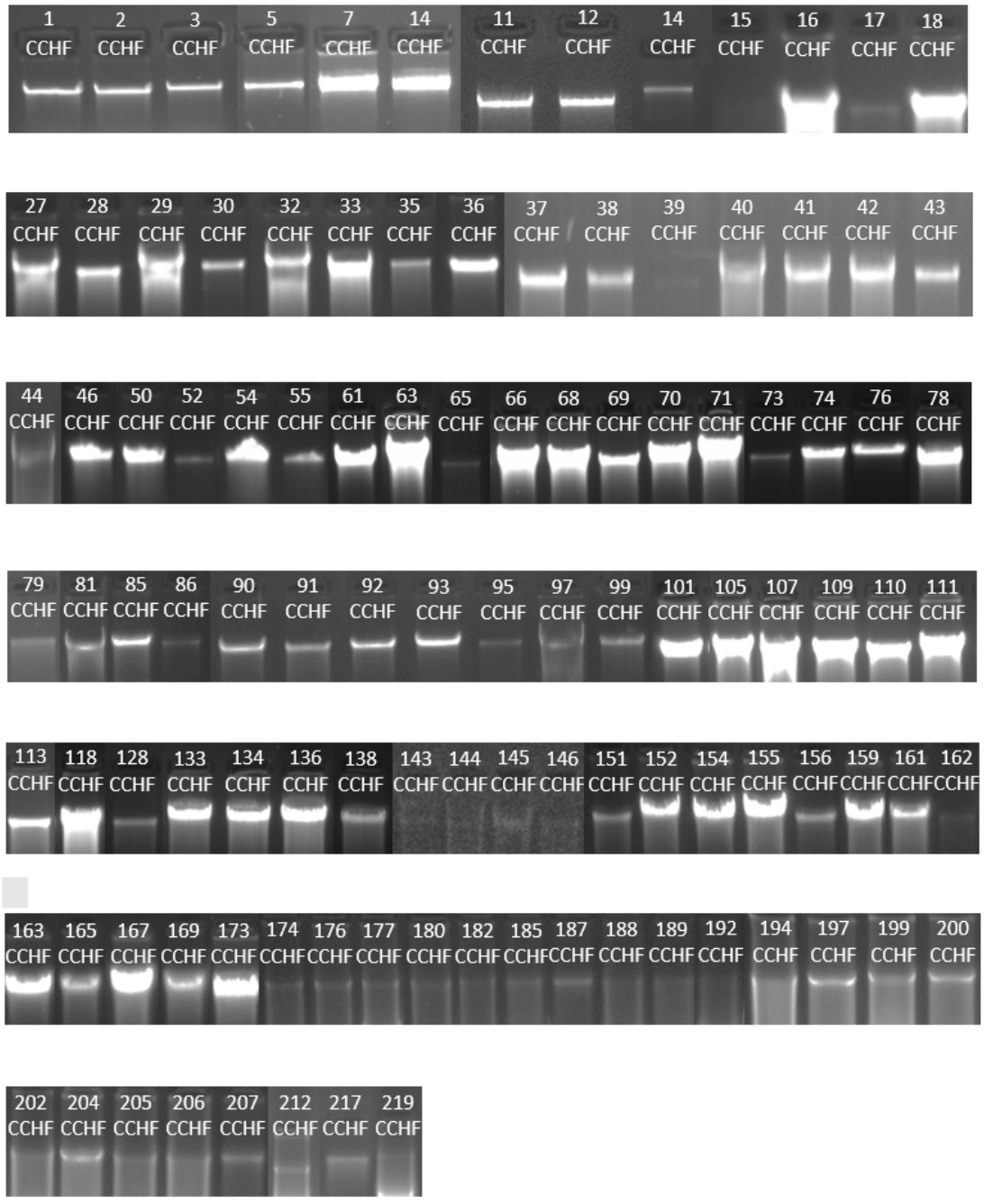
Znanstveni radovi iz skupine a1:

1. Brajkovic V., Duvnjak I., Ferenčaković M., Špehar M., Raguž N., Lukić B., Curik I., Cubric-Curik V. (2018). The effect of DNA quality on the sequencing success of cattle. J Cent Eur Agric 19: 804-9
2. Nguyen T.N., Brajkovic V., Cubric-Curik V., Ristov S., Veir Z., Szendrő Z., Nagy I., Curik I. (2018). Analysis of the impact of cytoplasmic and mitochondrial inheritance on litter size and carcass in rabbits. World Rabbit Sci 26: 287
3. Iacolina L., Brajković V., Canu A., Šprem N., Cubric-Curik V., Fontanesi L., Saarma U., Apollonio M., Scandura M. (2016). Novel Y-chromosome short tandem repeats in Sus scrofa and their variation in European wild boar and domestic pig populations. Anim Genet 47: 682-90
4. Ristov S., Brajkovic V., Cubric-Curik V., Michieli I., Curik I. (2016). MaGelLAn 1.0: a software to facilitate quantitative and population genetic analysis of maternal inheritance by combination of molecular and pedigree information. Genet Select Evol 48: 65

Znanstveni radovi iz skupine a2:

1. Brajkovic V., Beljan S., Kaštelanac I., Oršanić M., Ugarković D., Curik I., Veir Z., Cubric-Curik V. (2017). DNA Sequence Variation in the Mitochondrial Control Region of Oryctolagus cuniculus from Croatia. Agric Conspec Sci 82: 117-21
2. Ferenčaković M., Spehar M., Brajkovic V., Cubric-Curik V., Sölkner J., Curik I. (2017). The Impact of Cytoplasmic Inheritance on Sperm Quality in Fleckvieh Bulls. Agric Conspec Sci 82: 89-92
3. Spehar M., Ferenčaković M., Brajkovic V., Curik I. (2017). Variance Estimation of Maternal Lineage Effect on Milk Traits in Croatian Holstein Cattle. Agric Conspec Sci 82: 263-6

9. PRILOZI



Slika 19. Integritet DNA 109 uzoraka holstein goveda iz Republike Hrvatske prikazan na gel elektroforezi.

Tablica 17. Lista uzorkovanih jedinki holstein goveda iz Republike Hrvatske i popratne informacije.

Lab_ID	ID_anim	Founder	AH	H	EV	Frek	Sum	redni	MTP	Farma	Mjesto	Žup	Long	Lat	A260/A280	Konc. (ng/µl)
CCHF_01	HR6200041227	HR0099117618	36	2	34	43	339	7	T3	TOMISLAV STRIKA	MAJUR	ZGŽ	16.68873	45.9198	1.833	49.5
CCHF_02	HR2200041245	HR0099123142	32	3	33	21	168	60	T3	MARIO SABOLIC	ZVONIK	ZGŽ	16.63683	45.899	1.881	39.5
CCHF_03	HR1200227611	HR0099117635	23	4	37	20	129	139	T3r	TOMISLAV BUKAL	PRASCEVAC	ZGŽ	16.65129	45.9207	1.75	63
CCHF_05	HR4200099734	HR0099110001	23	5	34	41	213	26	T3	MARIJANA PREVAREK	VRHOVEC	ZGŽ	16.30376	45.8995	1.778	8
CCHF_07	HR8200170822	HR0099115184	23	6	33	28	168	59	T3	MARIN BASREK	GOSTOVIC	ZGŽ	16.44502	45.9288	1.906	30.5
CCHF_10	HR9200208238	HR0099117629	23	7	38	18	143	101	T3r	MARIJANA PREVAREK	VRHOVEC	ZGŽ	16.30376	45.8995	1.88	23.5
CCHF_11	HR5102005045	HR0065090957	23	8	34	26	221	24	T3	ANTE ODORCIC	KOMPOLJE	LSŽ	15.14491	44.9214	1.882	48
CCHF_12	HR6101875181	HR0099215491	9	9	35	29	198	37	T3g	MILAN SKORIC	HRVATSKO POLJE	LSŽ	15.11765	44.907	1.779	68.5
CCHF_14	HR8101946768	HR0061093153	23	10	37	16	125	151	T3r	ZELJKO KALCIC	LUC	OBŽ	18.5356	45.7852	1.625	6.5
CCHF_15	HR6102032855	HR0099119955	23	11	36	21	139	109	T3r	BOZIDAR GLAVAS	BIZOVAC	OBŽ	18.45054	45.5901	1.8	4.5
CCHF_16	HR1101886720	DE0578409079	23	12	32	23	112	191	T3	BOZIDAR GLAVAS	BIZOVAC	OBŽ	18.45054	45.5901	1.894	107
CCHF_17	HR8101897295	HR0058011010	23	13	32	14	111	195	T3	BOZIDAR GLAVAS	BIZOVAC	OBŽ	18.45054	45.5901	1.909	10.5
CCHF_18	HR9101897467	HR0058020212	6	14	32	16	111	196	T3h	BOZIDAR GLAVAS	BIZOVAC	OBŽ	18.45054	45.5901	1.896	45.5
CCHF_27	HR0200199616	HR0061096665	34	15	34	45	283	10	T3	KRNDIJA D.O.O.	KRNDIJA	OBŽ	18.41134	45.433	1.899	151
CCHF_28	HR1101838895	HR0061070021	23	16	32	18	193	41	T3	KRNDIJA D.O.O.	KRNDIJA	OBŽ	18.41134	45.433	1.783	41
CCHF_29	HR9101838833	HR0061070258	23	17	32	18	163	73	T3	KRNDIJA D.O.O.	KRNDIJA	OBŽ	18.41134	45.433	1.855	160
CCHF_30	HR3200084979	HR0099114379	1	18	32	22	153	86	T3	KRNDIJA D.O.O.	KRNDIJA	OBŽ	18.41134	45.433	1.76	22
CCHF_32	HR9200000108	HR0061070096	23	19	32	16	141	104	T3	KRNDIJA D.O.O.	KRNDIJA	OBŽ	18.41134	45.433	1.851	174
CCHF_33	HR1200084881	HR0099111854	29	20	34	15	114	182	T3	KRNDIJA D.O.O.	KRNDIJA	OBŽ	18.41134	45.433	1.894	117

Tablica 17. Lista uzorkovanih jedinki holstein goveda iz Republike Hrvatske i popratne informacije (nastavak).

Lab_ID	ID_anim	Founder	AH	H	EV	Frek	Sum	redni	MTP	Farma	Mjesto	Žup	Long	Lat	A260/A280	Konc. ng/µl)
CCHF_35	HR1200084959	HR0061070367	23	21	33	15	113	187	T3b	KRNDIJA D.O.O.	KRNDIJA	OBŽ	18.41134	45.433	1.931	28
CCHF_36	HR9200153141	HR0058011603	23	22	33	35	298	8	T3b	VLADE DOMAZET	PERUSIC	LSŽ	15.3831	44.6489	1.941	33
CCHF_37	HR2200083450	HR0065090777	23	23	35	23	298	9	T3g	HANA D.O.O.	NASICE	OBŽ	18.09529	45.4948	1.849	79.5
CCHF_38	HR3102046132	HR0060041775	15	24	36	33	257	14	T3r	HANA D.O.O.	NASICE	OBŽ	18.09529	45.4948	1.833	38.5
CCHF_39	HR4101940939	HR0060042995	23	25	38	24	253	15	T3r	HANA D.O.O.	NASICE	OBŽ	18.09529	45.4948	1.556	7
CCHF_40	HR2101940948	HR0060042131	23	26	32	25	223	22	T3	HANA D.O.O.	NASICE	OBŽ	18.09529	45.4948	1.875	158
CCHF_41	HR9200083608	HR0099117619	11	27	31	20	179	47	T3	HANA D.O.O.	NASICE	OBŽ	18.09529	45.4948	1.85	105
CCHF_42	HR5101940910	HR0060041891	25	28	34	22	154	84	T3	HANA D.O.O.	NASICE	OBŽ	18.09529	45.4948	1.876	106
CCHF_43	HR6102046162	HR0060041834	27	29	38	16	123	160	T3r	HANA D.O.O.	NASICE	OBŽ	18.09529	45.4948	1.824	31
CCHF_44	HR2102011175	HR0099131559	23	30	36	11	113	190	T3r	HANA D.O.O.	NASICE	OBŽ	18.09529	45.4948	1.887	217
CCHF_46	HR2200053291	HR0099110505	40	31	34	23	196	39	T3	FRANJO MACICEK	ZABJAK	BBŽ	16.7314	45.9289	1.945	53.5
CCHF_50	HR3200166332	HR0060041321	14	32	33	25	171	52	T3	FRANJO MACICEK	ZABJAK	BBŽ	16.7314	45.9289	1.978	45.5
CCHF_52	HR9101982398	HR0099110517	23	33	34	24	166	65	T3	FRANJO MACICEK	ZABJAK	BBŽ	16.7314	45.9289	2.8	7
CCHF_54	HR9200144677	HR0060040421	23	33	34	17	154	83	T3	FRANJO MACICEK	ZABJAK	BBŽ	16.7314	45.9289	1.891	60.5
CCHF_55	HR5101983375	HR0060041235	18	34	2	12	123	159	T3	ZORAN SMOLJANAC	BIJELO BRDO	OBŽ	18.88184	45.5129	2.125	25.5
CCHF_61	HR4101897116	HR0058012387	23	35	33	37	275	11	T3b	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.91	95.5
CCHF_63	HR9200087615	HR0058012170	23	36	31	38	225	19	T3h	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.881	260
CCHF_65	HR6101990200	HR0058011686	23	6	33	27	155	81	T3	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	2.036	57
CCHF_66	HR8200087854	HR0058020039	12	37	32	32	201	33	T3o	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.902	194
CCHF_68	HR2101897374	HR0058011063	23	38	36	28	192	42	T3r	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.864	55
CCHF_69	HR5200050561	HR0058010892	23	38	36	17	152	87	T3r	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.871	94.5

Tablica 17. Lista uzorkovanih jedinki holstein goveda iz Republike Hrvatske i popratne informacije (nastavak).

Lab_ID	ID_anim	Founder	AH	H	EV	Frek	Sum	redni	MTP	Farma	Mjesto	Žup	Long	Lat	A260/A280	Konc. ng/µl)
CCHF_70	HR1101990111	HR0058011505	4	39	33	17	136	114	T3	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.917	196
CCHF_71	HR4101897417	HR0057278361	2	40	32	19	135	118	T3d	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.926	78
CCHF_73	HR2101990202	HR0058020770	34	15	34	21	134	121	T3	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.947	18.5
CCHF_74	HR6101990093	HR0099115504	31	41	33	21	132	131	T3	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.881	39.5
CCHF_76	HR3200050651	HR0099334980	48	42	32	17	123	162	T3	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.757	32.5
CCHF_78	HR9200087770	HR0057277235	41	43	33	16	122	163	T3	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.889	68
CCHF_79	HR5200087510	HR0061099262	23	44	32	18	116	175	T1b	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.846	12
CCHF_81	HR3101897261	HR0099126926	44	45	38	18	114	183	T3r	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	1.852	75
CCHF_85	HR1101998805	HR0058012216	23	46	34	13	213	25	T3	VRANA D.O.O.	BIOGRAD NA MORU	ZDŽ	15.46969	43.9559	1.878	46
CCHF_86	HR4101998796	HR0058011354	23	47	34	20	209	28	T3n	VRANA D.O.O.	BIOGRAD NA MORU	ZDŽ	15.46969	43.9559	1.348	15.5
CCHF_90	HR8101768296	HR0058011868	23	47	34	22	166	63	T3n	VRANA D.O.O.	BIOGRAD NA MORU	ZDŽ	15.46969	43.9559	1.889	42.5
CCHF_91	HR3101998809	HR0058011249	23	48	36	22	164	69	T3r	VRANA D.O.O.	BIOGRAD NA MORU	ZDŽ	15.46969	43.9559	1.757	32.5
CCHF_92	HR1101768404	HR0058010985	33	49	38	15	157	79	T3r	VRANA D.O.O.	BIOGRAD NA MORU	ZDŽ	15.46969	43.9559	1.818	40
CCHF_93	HR9101998937	HR0058011608	37	50	33	8	115	178	T3p	VRANA D.O.O.	BIOGRAD NA MORU	ZDŽ	15.46969	43.9559	1.855	57.5
CCHF_95	HR2101998776	HR0058011424	23	51	32	11	146	96	T3	VRANA D.O.O.	BIOGRAD NA MORU	ZDŽ	15.46969	43.9559	1.966	28.5
CCHF_97	HR5101998764	HR0058011089	23	52	34	18	133	124	T3	VRANA D.O.O.	BIOGRAD NA MORU	ZDŽ	15.46969	43.9559	1.889	128
CCHF_99	HR1101998601	HR0058012667	23	51	32	18	131	133	T3	VRANA D.O.O.	BIOGRAD NA MORU	ZDŽ	15.46969	43.9559	1.882	32
CCHF_101	HR7200231917	HR0061096133	26	53	34	64	690	1	T3r	BELJE D.D.	MECE	OBŽ	18.68921	45.6251	1.887	58.5
CCHF_105	HR8200231639	HR0061000000	23	54	32	54	416	3	T3	BELJE D.D.	MECE	OBŽ	18.68921	45.6251	1.88	94
CCHF_107	HR5200153826	HR0061092298	21	55	34	28	191	43	T3	BELJE D.D.	MECE	OBŽ	18.68921	45.6251	1.887	150

Tablica 17. Lista uzorkovanih jedinki holstein goveda iz Republike Hrvatske i popratne informacije (nastavak).

Lab_ID	ID_anim	Founder	AH	H	EV	Frek	Sum	redni	MTP	Farma	Mjesto	Žup	Long	Lat	A260/A280	Konc. ng/µl)
CCHF_109	HR9200154566	HR0061098466	34	15	34	17	164	71	T3	BELJE D.D.	MECE	OBŽ	18.68921	45.6251	1.901	77
CCHF_110	HR9102001308	HR0061099806	23	56	34	13	128	141	T3	BELJE D.D.	MECE	OBŽ	18.68921	45.6251	1.843	47
CCHF_111	HR9102001861	HR0061092907	23	57	31	16	125	150	T3b	BELJE D.D.	MECE	OBŽ	18.68921	45.6251	1.887	91.5
CCHF_113	HR7200154148	HR0061096836	42	58	35	13	111	199	T3	BELJE D.D.	MECE	OBŽ	18.68921	45.6251	1.815	24.5
CCHF_118	HR6200231664	HR0061084034	47	59	32	31	224	21	T3	BELJE D.D.	MECE	OBŽ	18.68921	45.6251	1.86	80
CCHF_128	HR2102039472	HR0060061456	23	60	34	25	234	16	T3	VUPIK D.D.	VUKOVAR	VSŽ	19.00383	45.3306	1.81	19
CCHF_133	HR4200169468	HR0060065996	23	48	36	14	143	99	T3r	VUPIK D.D.	VUKOVAR	VSŽ	19.00383	45.3306	1.892	88
CCHF_134	HR0102039177	HR0060064570	23	61	37	14	135	120	T3r	VUPIK D.D.	VUKOVAR	VSŽ	19.00383	45.3306	1.869	100
CCHF_136	HR2101927691	HR0060065690	23	62	36	15	131	134	T3r	VUPIK D.D.	VUKOVAR	VSŽ	19.00383	45.3306	1.876	160
CCHF_138	HR4200169455	HR0060061764	23	61	37	15	128	140	T3r	VUPIK D.D.	VUKOVAR	VSŽ	19.00383	45.3306	1.824	46.5
CCHF_143	HR7200089888	HR0060042039	23	63	35	18	212	27	T3g	DOMACINOVIC D.O.O.	BOSNJACI	VSŽ	18.69526	45.0781	1.876	226
CCHF_144	HR0200098971	HR0060041843	23	64	32	13	173	51	T3	DOMACINOVIC D.O.O.	BOSNJACI	VSŽ	18.69526	45.0781	1.836	140
CCHF_145	HR3200090660	HR0060041617	23	65	36	21	168	56	T3r	DOMACINOVIC D.O.O.	BOSNJACI	VSŽ	18.69526	45.0781	1.845	131
CCHF_146	HR3200085462	HR0060041700	24	66	37	15	160	75	T3r	DOMACINOVIC D.O.O.	BOSNJACI	VSŽ	18.69526	45.0781	1.879	31
CCHF_151	HR9200018642	HR0061074129	23	21	33	40	419	2	T3b	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.853	31.5
CCHF_152	HR1200176146	HR0061070001	23	67	33	34	394	4	T3	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.875	67.5
CCHF_154	HR7200018842	HR0061070084	23	68	32	27	271	12	T3	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.863	88.5
CCHF_155	HR4200018252	HR0061070222	23	21	33	18	227	18	T3b	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.93	138
CCHF_156	HR7200018295	HR0061070180	23	69	36	14	199	35	T3r	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.923	25
CCHF_159	HR7200175370	HR0061070027	17	70	37	14	197	38	T3r	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.883	97
CCHF_161	HR9200175853	HR0060033703	43	71	32	20	151	91	T3	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.899	75
CCHF_162	HR6200234256	HR0061070057	10	72	38	20	151	92	T3r	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	2	8

Tablica 17. Lista uzorkovanih jedinki holstein goveda iz Republike Hrvatske i popratne informacije (nastavak).

Lab_ID	ID_anim	Founder	AH	H	EV	Frek	Sum	redni	MTP	Farma	Mjesto	Žup	Long	Lat	A260/A280	Konc. (ng/µl)
CCHF_163	HR0101991597	HR0061072865	35	73	35	20	150	94	T3g	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.869	78.5
CCHF_165	HR9101820920	HR0073034734	23	74	37	17	143	100	T3r	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.867	56
CCHF_167	HR0200018319	HR0060033736	7	75	37	15	127	145	T3r	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.941	182
CCHF_169	HR4101821191	HR0061070187	35	73	35	13	113	186	T3g	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.896	73
CCHF_173	HR7200018253	HR0060033741	23	76	37	15	112	192	T3r	BOVIS D.O.O.	IVANKOVO	VSŽ	18.68411	45.2882	1.864	103
CCHF_174	HR1101886322	HR0099110583	3	77	32	15	124	155	T3	MIRKO KATALENIC	GUDOVAC	BBŽ	16.76869	45.8808	2.081	230
CCHF_176	HR8101886334	HR0099001914	23	78	34	10	111	201	T3p	MIRKO KATALENIC	GUDOVAC	BBŽ	16.76869	45.8808	2.074	366
CCHF_177	HR6200053943	HR0099110602	46	79	32	27	181	45	T3	DRAGO KOVAZIK	LAMINAC	BBŽ	16.74012	45.8046	2.085	342
CCHF_180	HR7200144534	HR0067050053	19	80	38	22	159	78	T3r	ZVONIMIR GRGURIC	PRGOMELJE	BBŽ	16.73655	45.8693	2.073	583
CCHF_182	HR6200151290	HR0057150007	16	81	33	24	139	108	T3	GORAN TKALICANAC	VELIKA PISANICA	BBŽ	17.02167	45.7942	2.053	596
CCHF_185	HR9200166059	HR0057150006	23	82	2	18	127	143	T3	VLADIMIR KUSTER	PRNJAVOR	BBŽ	16.80577	45.9881	2.079	185
CCHF_187	HR4101952820	HR0057150225	23	83	38	12	116	172	T3r	VLADIMIR KUSTER	PRNJAVOR	BBŽ	16.80577	45.9881	2.094	89
CCHF_188	HR5101924071	HR0099112116	23	84	38	22	138	111	T3r	"POLJOPRIV REDA" JOSIP VINCEKOVIC	VAGOVINA	BBŽ	16.6747	45.7811	2.075	445
CCHF_189	HR1101901933	HR0097000403	20	85	34	18	115	181	T3	DRAGUTIN SIMUNCIC	PAVLIN KLOSTAR	BBŽ	16.83022	46.0071	2.079	185
CCHF_192	HR8101924098	HR0099007855	28	86	32	30	132	129	T3n	ZLATKO PRAZETINA	DASKATICA	BBŽ	16.69984	45.7953	2.078	492
CCHF_194	HR2200118206	HR0099112567	23	87	38	36	178	48	T3r	ZELJKO MAVRIN	BABINAC	BBŽ	17.04156	45.8294	2.043	716
CCHF_197	HR1200144723	HR0099217778	27	29	38	22	152	90	T3r	IVAN KUKEC	GUDOVAC	BBŽ	16.77392	45.8835	2.072	347
CCHF_199	HR5200053001	HR0099117621	23	88	38	28	198	36	T3r	JOSIP KOVACEVIC	ZRINSKI TOPOLOVAC	BBŽ	16.74506	46.017	2.091	481
CCHF_200	HR6200024772	HR0099112985	22	89	37	33	184	44	T3r	IVAN COLIK	VELIKI GRÄ□EVAC	BBŽ	17.07701	45.7652	2.081	245
CCHF_202	HR2200024392	HR0099120369	38	90	37	24	169	55	T3r	IVAN ZBAN	MALA PISANICA	BBŽ	17.01942	45.7699	2.076	603

Tablica 17. Lista uzorkovanih jedinki holstein goveda iz Republike Hrvatske i popratne informacije (nastavak).

Lab_ID	ID_anim	Founder	AH	H	EV	Frek	Sum	redni	MTP	Farma	Mjesto	Žup	Long	Lat	A260/A280	Konc. (ng/µl)
CCHF_204	HR8200025311	HR0099116803	5	91	36	22	138	112	T3r	MARINKO BOGDAN	VELIKA MLINSKA	BBŽ	16.92054	45.6584	2.085	355
CCHF_205	HR0102023949	HR0099127687	39	92	5	26	180	46	T5x	MIRKO MAÄ□ERUH	MALI ZDENCI	BBŽ	17.12299	45.679	2.081	618
CCHF_206	HR4200024367	HR0099124716	8	93	33	12	113	188	T3	MIRKO VANJUREK	LADISLAV	BBŽ	16.98883	45.6898	2.068	656
CCHF_207	HR7101990061	HR0058011890	23	94	33	15	136	115	T3	VIGENS D.O.O.	PETRCANE	ZDŽ	15.18625	44.1828	2.078	134
CCHF_212	HR3200111329	HR0065092003	13	95	37	35	343	6	T3n	DANIJEL BUZDON	PULA	IŽ	13.85914	44.8741	2.085	442
CCHF_217	HR5200136287	HR0065091288	45	96	33	14	170	54	T3	KAZNIONICA U VALTURI	VALTURA	IŽ	13.90914	44.8994	1.833	11
CCHF_219	HR2102016581	HR0065090491	30	97	33	7	116	176	T3	MAURIZIO SKRINJAR	SKRINJARI	IŽ	13.62467	45.3789	2.076	476

Lab_ID – laboratorijska oznaka uzorka; ID_anim – oznaka životinje u pedigreu; Founder – oznaka za rod; AH – oznaka za aminokiselinski haplotip; H – oznaka za haplotip mitogenoma; EV – oznaka za evolucijsku haplogrupu; Frek – broj jedinki u rodu; Sum – sumirani fenotipski podaci; MTP – dodijeljena haplogrupa prema MitotoolPY analizi; Long/Lat – geografske koordinate farmi na kojima su se uzorkovala goveda; A260/A280 – oznaka za čistoću DNA; Konc.(ng/µl) – koncentracija DNA

Tablica 18. Konstruirani haplotipovi cijelih mitogenoma prikazani MJ mrežom.

Haplotip	Frekvencija	Fasta radno ime
H1	1	V00654_GBR_BRS_T3r
H2	1	CCHF_01_T3
H3	1	CCHF_02_T3
H4	1	CCHF_03_T3r
H5	1	CCHF_05_T3
H6	2	CCHF_07_T3, CCHF_65_T3
H7	1	CCHF_10_T3r
H8	1	CCHF_11_T3
H9	1	CCHF_12_T3g
H10	1	CCHF_14_T3r
H11	1	CCHF_15_T3r
H12	1	CCHF_16_T3
H13	1	CCHF_17_T3
H14	1	CCHF_18_T3h
H15	3	CCHF_27_T3, CCHF_73_T3, CCHF_109_T3
H16	1	CCHF_28_T3
H17	1	CCHF_29_T3
H18	1	CCHF_30_T3
H19	1	CCHF_32_T3
H20	1	CCHF_33_T3
H21	3	CCHF_35_T3b, CCHF_151_T3b, CCHF_155_T3b
H22	1	CCHF_36_T3b
H23	1	CCHF_37_T3g
H24	1	CCHF_38_T3r
H25	1	CCHF_39_T3r
H26	1	CCHF_40_T3
H27	1	CCHF_41_T3
H28	1	CCHF_42_T3
H29	2	CCHF_43_T3r, CCHF_197_T3r
H30	1	CCHF_44_T3r
H31	1	CCHF_46_T3
H32	1	CCHF_50_T3
H33	2	CCHF_52_T3, CCHF_54_T3
H34	1	CCHF_55_T2
H35	1	CCHF_61_T3b
H36	1	CCHF_63_T3h
H37	1	CCHF_66_T3o
H38	2	CCHF_68_T3r, CCHF_69_T3r
H39	1	CCHF_70_T3
H40	1	CCHF_71_T3d
H41	1	CCHF_74_T3

Tablica 18. Konstruirani haplotipovi cijelih mitogenoma prikazani MJ mrežom (nastavak).

Haplotip	Frekvencija	Fasta radno ime
H42	1	CCHF_76_T3
H43	1	CCHF_78_T3
H44	1	CCHF_79_T1b
H45	1	CCHF_81_T3r
H46	1	CCHF_85_T3
H47	2	CCHF_86_T3n, CCHF_90_T3n
H48	2	CCHF_91_T3r, CCHF_133_T3r
H49	1	CCHF_92_T3r
H50	1	CCHF_93_T3p
H51	2	CCHF_95_T3, CCHF_99_T3
H52	1	CCHF_97_T3
H53	2	CCHF_101_T3r, EU177821_ITALIJA_Frie_T3r
H54	1	CCHF_105_T3
H55	1	CCHF_107_T3
H56	1	CCHF_110_T3
H57	1	CCHF_111_T3b
H58	1	CCHF_113_T3
H59	1	CCHF_118_T3
H60	1	CCHF_128_T3
H61	2	CCHF_134_T3,r CCHF_138_T3r
H62	1	CCHF_136_T3r
H63	1	CCHF_143_T3g
H64	1	CCHF_144_T3
H65	1	CCHF_145_T3r
H66	1	CCHF_146_T3r
H67	1	CCHF_152_T3
H68	1	CCHF_154_T3
H69	1	CCHF_156_T3r
H70	1	CCHF_159_T3r
H71	1	CCHF_161_T3
H72	1	CCHF_162_T3r
H73	2	CCHF_163_T3g, CCHF_169_T3g
H74	1	CCHF_165_T3r
H75	1	CCHF_167_T3r
H76	1	CCHF_173_T3r
H77	1	CCHF_174_T3
H78	1	CCHF_176_T3p
H79	1	CCHF_177_T3
H80	1	CCHF_180_T3r
H81	1	CCHF_182_T3
H82	1	CCHF_185_T2

Tablica 18. Konstruirani haplotipovi cijelih mitogenoma prikazani MJ mrežom (nastavak).

Haplotip	Frekvencija	Fasta radno ime
H83	1	CCHF_187_T3r
H84	1	CCHF_188_T3r
H85	1	CCHF_189_T3
H86	1	CCHF_192_T3n
H87	1	CCHF_194_T3r
H88	1	CCHF_199_T3r
H89	1	CCHF_200_T3r
H90	1	CCHF_202_T3r
H91	1	CCHF_204_T3r
H92	1	CCHF_205_T5
H93	1	CCHF_206_T3
H94	1	CCHF_207_T3
H95	1	CCHF_212_T3n
H96	1	CCHF_217_T3
H97	1	CCHF_219_T3
H98	1	JN817331_FRANCUSKA_Limo_T1a
H99	1	JN817350_ITALIJA_Chia_T1b
H100	1	KF163063_ZAF_Ngun_T1b
H101	1	JN817324_EGY_Domi_T1b
H102	1	JN817305_ETH_Bora_T1b
H103	1	EU177848_IRQ_Iraq_T1c
H104	1	JN817300_PRT_Alen_T1c
H105	1	KT184458_EGY_Menf_T2
H106	1	EU177849_GRC_Gree_T2
H107	1	EU177850_ITALIJA_Caba_T2
H108	1	EU177858_IRN_Iran_T2
H109	1	EU177861_ITALIJA_Rend_T2c
H110	1	KJ709683_DEU_RMou_T3
H111	1	DQ124416_KOR_HoFr_T3b
H112	1	AY676861_FRANCUSKA_Char_T3d
H113	1	GU947021_USA_Long_T3g
H114	1	DQ124411_KOR_HoFr_T3h
H115	1	AY676857_GBR_Angu_T3n
H116	1	DQ124407_KOR_HoFr_T3o
H117	1	EU177825_ITALIJA_Chia_T3p
H118	1	GQ129207_HUN_HunG_T3r
H119	1	EU177862_ITALIJA_Vald_T5a
H120	1	EU177863_ITALIJA_Pied_T5a
H121	1	EU177864_IRQ_Iraq_T5b
H122	1	EU177865_IRQ_Iraq_T5b
H123	1	KY766256_CHN_HoFr_T3r

Tablica 18. Konstruirani haplotipovi cijelih mitogenoma prikazani MJ mrežom (nastavak).

Haplotip	Frekvencija	Fasta radno ime
H124	1	KY766257_CHN_HoFr_T3r
H125	1	KY766258_CHN_HoFr_T3o
H126	1	DQ124404_KOR_HoFr_T3
H127	1	DQ124405_KOR_HoFr_T3
H128	1	DQ124406_KOR_HoFr_T3
H129	1	DQ124408_KOR_HoFr_T3r
H130	1	DQ124409_KOR_HoFr_T3c
H131	1	DQ124410_KOR_HoFr_T3c
H132	1	DQ124412_KOR_HoFr_T4
H133	1	DQ124413_KOR_HoFr_T3r
H134	1	DQ124414_KOR_HoFr_T3
H135	1	DQ124415_KOR_HoFr_T3r
H136	1	DQ124417_KOR_HoFr_T3a
H137	1	DQ124418_KOR_HoFr_T3a
H138	1	EU177826_ITALIJA_Frie_T3q
H139	1	EU177827_ITALIJA_Frie_T3q
H140	1	EU177847_ITALIJA_Frie_T1c
H141	2	SRR934414_KOR_HoFr_T3b, SRR934413_KOR_HoFr_T3b
H142	2	SRR934412_KOR_HoFr_T3r, SRR934410_KOR_HoFr_T3r
H143	2	SRR934411_KOR_HoFr_T3, SRR934408_KOR_HoFr_T3
H144	1	SRR934409_KOR_HoFr_T3
H145	3	SRR934407_KOR_HoFr_T3, SRR934406_KOR_HoFr_T3, SRR934405_KOR_HoFr_T3,
H146	1	SRR1348592_CAN_HoFr_T3
H147	1	SRR1346386_NLD_HoFr_T3
H148	1	SRR1365147_NLD_HoFr_T3g

*napomena: zbog nemogućnosti DNAsp programa u prepoznavanju naziva referentnih nukleotidnih sljedova većih od 20 slova, s ciljem da se zadrži informativnost kod obrade podataka, korišteno je FASTA radno ime.

Tablica 19. Popis aminokiselina i njihove kratice.

Aminokiseline	Jednoslovna kratica	Troslovna kratica
alanin	A	Ala
arginin	R	Arg
asparagin	N	Asn
asparaginska kiselina	D	Asp
cistein	C	Cys
fenilalanin	F	Phe
glicin	G	Gly
glutamin	Q	Gln
glutaminska kiselina	E	Glu
histidin	H	His
izoleucin	I	Ile
leucin	L	Leu
lizin	K	Lsy
metionin	M	Met
prolin	P	Pro
serin	S	Ser
tirozin	Y	Tyr
treonin	T	Thr
triptofan	W	Trp
valin	V	Val