

Povezanost polimorfizama MTNR1A gena i sezonske poliestričnosti ovaca

Držaić, Valentino

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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:204:673755>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Valentino Držaić

**POVEZANOST POLIMORFIZAMA
MTNR1A GENA I SEZONSKE
POLIESTRIČNOSTI OVACA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Valentino Držaić

**ASSOCIATION OF THE MTNR1A GENE
POLYMORPHISMS AND SEASONAL
REPRODUCTION IN SHEEP**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016



Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

VALENTINO DRŽAIĆ

**POVEZANOST POLIMORFIZAMA
MTNR1A GENA I SEZONSKE
POLIESTRIČNOSTI OVACA**

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof.dr.sc. Boro Mioč

prof.dr.sc. Peter Dovč

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Valentino Držaić

**ASSOCIATION OF THE MTNR1A GENE
POLYMORPHISMS AND SEASONAL
REPRODUCTION IN SHEEP**

DOCTORAL THESIS

Supervisors: Boro Mioč, Ph.D. Full Professor

Peter Dovč, Ph.D. Full Professor

Zagreb, 2016

Bibliografski podaci:

- Znanstveno područje: biotehničke znanosti
- Znanstveno polje: poljoprivreda
- Znanstvena grana: stočarstvo
- Institucija: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za specijalno stočarstvo
- Voditelji doktorskog rada: prof.dr.sc. Boro Mioč, prof.dr.sc. Peter Dovč
- Broj stranica: 149
- Broj slika: 47
- Broj tablica: 37
- Broj priloga: 4
- Broj literaturnih referenci: 206
- Datum obrane doktorskog rada: 16.12.2016.
- Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:
 - Prof.dr.sc. Ante Ivanković
 - Prof. emerita Vesna Pavić
 - Prof.dr.sc. Velimir Sušić

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 6. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog Fakulteta, održanoj 1. ožujka 2016. godine te odobrena na 10. sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 19. svibnja 2016. godine.

Ocjena doktorskog rada

Ovu disertaciju je ocijenilo povjerenstvo u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Ante Ivanković
2. Prof. emerita Vesna Pavić
3. Prof.dr.sc. Velimir Sušić

Disertacija je obranjena na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu
_____ pod povjerenstvom u sastavu:

1. Prof.dr.sc. Ante Ivanković, _____
 2. Prof. emerita Vesna Pavić, _____
 3. Prof.dr.sc. Velimir Sušić, _____
-

Informacije o mentorima

Prof.dr.sc. Boro Mioč

Boro Mioč sveučilišni profesor u trajnom zvanju, od početka 1987. zaposlen je na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu. U proteklom razdoblju aktivno je sudjelovao u izvođenju nastave na prediplomskim, diplomskim i poslijediplomskom doktorskom studiju kao koordinator i suradnik na više modula. Trenutačno obnaša dužnost voditelja poslijediplomskog dokorskog studija Poljoprivredne znanosti. Kao autor ili koautor objavio je oko 250 indeksiranih znanstvenih radova te oko 90 stručnih i popularnih članaka. Bio je voditelj više znanstvenih i stručnih projekata. U suautorstvu je napisao više sveučilišnih udžbenika, knjiga, poglavlja u knjigama. Aktivno je sudjelovao na brojnim međunarodnim i domaćim znanstvenim i stručnim savjetovanjima. Član je međunarodnog udruženja kozarskih stručnjaka (IGA: International Goat Asociation), Hrvatske mljekarske udruge i Hrvatskog agronomskog društva. Predsjednik je Savjeta uzgojnog programa iz Ovčarstva i kozarstva, član Vijeća biotehničkog područja, član Povjerenstva za sveučilišnu literaturu Sveučilišta u Zagrebu te član uređivačkog odbora časopisa Stočarstvo. Od 1998. do 2012. bio je predstojnik Zavoda za specijalno stočarstvo, a od akademske 2012./13. godine do danas prodekan je za znanost na Agronomskom fakultetu. Pročelnik je Sekcije za stočarstvo u Znanstvenom vijeću za poljoprivredu i šumarstvo u Hrvatskoj akademiji znanosti i umjetnosti.

Prof. dr.sc. Peter Dovč

Peter Dovč sveučilišni profesor genetike i animalne biotehnologije na Sveučilištu u Ljubljani Biotehničkom fakultetu trenutno obnaša dužnost prodekana za područje zootehnike. Diplomirao je na Biotehničkom fakultetu u Ljubljani 1981. godine, a titulu doktora znanosti stekao je na Tehnische Universität München 1988. godine. Nakon što je dobio postdoktorsko mjesto na Justus Liebig Universität, Giessen and Ludwig Maximilian Universität München pridružuje se novoosnovanom Gendiagnosezentrum in Grub bei München. Akademske godine 1994./1995. bio je na stipendiji na Department of Animal Science, University of California, Davis, USA. Autor je i koautor više od 100 znanstvenih radova u međunarodnim časopisima i nekoliko poglavlja u knjigama. Trenutni istraživački ciljevi su mu vezani uz identifikaciju kandidat gena za proizvodna svojstva i genetske bolesti u domaćih životinja, biologiju laktacije, karakterizaciju matičnih stanica, kozervacijsku genetiku i analizu animalnog genoma. Član je Agrobiotehnološkog odbora Europske Biotehnoške Federacije i Nacionalnog istraživačkog koncila.

Zahvala

Zahvaljujem prof.dr.sc. Bori Mioču na mentorstvu, konstruktivnim sugestijama i nesebičnoj potpori u organizaciji i provedbi terenskog dijela istraživanja kao i na sveobuhvatnom angažmanu na izradi doktorskog rada..

Zahvaljujem prof.dr.sc. Peteru Dovču na mentorstvu, pomoći, savjetima i susretljivosti tijekom provedbe laboratorijskih analiza.

Zahvaljujem kolegi Anti Kasapu na pomoći oko odabira statističkog modela i obrade podataka.

Zahvaljujem kolegici Jeleni Ramljak na savjetima i pomoći oko prikaza i interpretacije rezultata.

Zahvaljujem svojoj supruzi Ivani na velikoj podršci, razumijevanju i pomoći tijekom studija, a posebno za vrijeme izrade doktorskog rada.

Također zahvaljujem svima koji su na bilo koji način dali doprinosi prilikom izrade ovog doktorskog rada.

Valentino Držaić, mag.ing.agr.

Sažetak

U radu je istraživana utjecaj polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na sezonsku poliestričnost ovaca. Ciljevi predmetnog istraživanja bili su: 1) utvrditi frekvencije genotipova i alelnih varijanti MTNR1A gena na pozicijama 606 i 612 referentne sekvence U14109, 2) utvrditi prisutnost polimorfizama na istraživanoj sekvenci drugog egzona MTNR1A gena, 3) utvrditi utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na sezonsku poliestričnost, dob ovaca pri prvom janjenju i dužinu međujanjidbenog razdoblja. Prikupljanje biološkog materijala (krv, tkivo, dlaka) i reproduksijskih pokazatelja ovaca provedeno je tijekom 2015. i 2016. godine na području Republike Hrvatske i Republike Slovenije ovisno o mjestu uzgoja pojedine pasmine. U Hrvatskoj su prikupljeni uzorci od hrvatskih autohtonih pasmina ovaca: cigaje, dalmatinske pramenke, dubrovačke ovce, istarske ovce, ličke pramenke i paške ovce, zatim uvezenih pasmina ovaca: istočnofrizijske ovce, romanovske ovce i Suffolka, dok su u lovištu nakon usmrćivanja (odstrela) prikupljeni uzorci muflona. U Sloveniji su prikupljeni uzorci od slovenske autohtone pasmine: bovške ovce. Izuzev plemenitih pasmina ovaca koje odlikuje produženo razdoblje pripusne sezone, preostale pasmine odlikuje sezonska pojava spolnog ciklusa te slove kao sezonski poliestrične. Ukupno je prikupljeno 439 uzoraka iz kojih je napravljena izolacija genomske DNK. Nakon izolacije genomske DNK sa specifičnim začetnim oligonukleotidima amplificiran je glavni dio drugog egzona MTNR1A gena dužine 824 bazna para koji je podvrgnut enzimatskoj razgradnji. Za detekciju polimorfizama na lokusima 606 i 612 korištena je *RsaI* odnosno *MnII* restrikcijska endonukleaza. Genotipizacija uzoraka bila je sljedeća: CC, CT i TT na lokusu 606 prema *RsaI* restrikcijskoj endonukleazi te GG, GA i AA na lokusu 612 prema *MnII* restrikcijskoj endonukleazi. U pet uzoraka svakog genotipa utvrđenog *MnII* restrikcijskom endonukleazom određen je slijed nukleotida na ciljnom odsječku istraživane DNK i potvrđena prisutnost polimorfizama na istraživanim lokusima (606 i 612) te detektirano 6 dodatnih mutacija. Polimorfizam na lokusu 606 se očitovao prisutnošću citozina (alel C) umjesto timina (alel T), dok se polimorfizam na lokusu 612 očitovao prisutnošću gvanina (alel G) umjesto adenina (alel A). Preostalih šest mutacija bile su: G453T, G706A, G783A, G801A, C891T i C893A. Na lokusu 606 MTNR1A gena u muflona, romanovske i Suffolk pasmine utvrđene su visoke frekvencije alela C dok su u sezonski poliestričnih pasmina ovaca, utvrđene veće frekvencije alela T. Na lokusu 612 u gotovo svih istraživanih pasmina ovaca, utvrđena je visoka frekvencija alela G (od 0,50 do 0,95) izuzev muflona u kojeg je utvrđena visoka frekvencija alela A (0,93). U istraživanih ovaca utvrđena su janjenja u svim istraživanim sezonama, a bez obzira na genotip na lokusu 606 i 612 najveći broj janjenja je utvrđen tijekom zime (61,89%). Po broju janjenja tijekom ljeta dominirali su homozigoti (CC/606; GG/612) i heterozigoti (CT/606; GA/612) za oba promatrana lokusa. Rezultatima predmetnog istraživanja nije utvrđen statistički značajan utjecaj polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na sezonsku poliestričnost ovaca, dob pri prvom janjenju niti na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja. Prisutnost polimorfizama na lokusu 612 povoljno je djelovala na pojavu janjenja izvan uobičajene sezone (ljetu i/ili jesen) u cigaje, istarske ovce, ličke pramenke i romanovske ovce, zatim na janjenja s manjom dobi u cigaje, dalmatinske pramenke, istočnofrizijske ovce, ličke pramenke i romanovske ovce te na kraće međujanjidbeno razdoblje u cigaje, dubrovačke, istarske, istočnofrizijske i romanovske ovce.

Ključne riječi: sezonska poliestričnost, ovce, pasmina, MTNR1A gen, lokus 606 i 612, *RsaI* i *MnII* restrikcijska endonukleaza, polimorfizam, genotipovi

Association of the MTNR1A gene polymorphisms and seasonal reproduction in sheep

Expanded summary

Seasonal reproduction is a common feature among various mammalian species of the temperate latitudes. Ewes are well known for seasonal breeding activity which usually appears at the end of summer or at the beginning of autumn and finish in late winter or at the very beginning of spring. The seasonality of reproductive activity in sheep breeds in temperate latitudes is controlled by the photoperiod. In sheep, short photoperiods stimulate pineal gland to synthesize hormone melatonin, while long photoperiods inhibit pineal gland in melanin synthesis. Therefore, melatonin inform animal on photoperiod changes and has stimulating effect on hypothalamus which release Gonadotropin-releasing hormone. Pituitary gland stimulated by hypothalamus release Luteinizing hormone which affects the growth of oocytes. In sheep melatonin exerts its function through specific MT1 G-protein receptor. Gene for this receptor (MTNR1A gene) is located on chromosome 26 and has two polymorphic sites at position 606 and 612 which are associated to aseasonal breeding activity. Considering that MTNR1A gene has been proposed as candidate gene for out of season breeding in sheep, present study evaluates the effects of polymorphisms at positions 606 and 612 on sheep seasonal reproduction. The objectives of the study were: 1) determine the frequency of genotypes and allele variants of MTNR1A gene at positions 606 and 612 (reference sequence U14109), 2) determine the presence of polymorphisms on the studied sequences on the second exon of MTNR1A gene, 3) determine the effect of MTNR1A gene polymorphisms on seasonal reproduction, age at first lambing and interval between lambing. Depending on breeding place the biological material (blood, tissue, hair) and sheep reproductive parameters were collected during 2015 and 2016 year in the area of Republic of Croatia and Republic of Slovenia. Samples of Croatian indigenous sheep breeds (Tsigai sheep, Dalmatian Pramenka, Dubrovnik sheep, Istrian sheep, Lika Pramenka sheep and Pag Island sheep), imported noble sheep breeds (East Friesian sheep, Romanov sheep and Suffolk), as well as mouflon (*Ovis musimon*) samples (from hunting grounds) were collected in Croatia. In Slovenia were collected samples of Slovenian indigenous breed: Bovec sheep. Except for noble sheep breeds which are characterized by a prolonged period of mating season, the rest of breeds express seasonal sexual activity and they are considered as seasonal polyestric sheep breeds. From 439 collected samples genomic DNA was extracted using GenElute® Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). After DNA extraction, the main part of second exon MTNR1A gene was amplified using specific primers (forward: 5'-TGTGTTTGTGGTGAGCCTGG-3'; reverse: 3'-ATTTGCGTTTGGGAGAGGTA-5') adopted from Messer et al (1997). Obtained sequence length was 824 base pairs which was then subjected to enzymatic resolution with *RsaI* and *MnII* restriction endonucleases. Polymorphism at position 606 was detected using *RsaI*, while polymorphism at position 612 was detected using *MnII* restriction endonucleases. Samples were genotyped as follows: CC, CT or TT on locus 606 and GG, GA or AA on the locus 612 of MTNR1A gene. In five samples of each genotype determined with *MnII* restriction endonucleases nucleotide sequence were determined in the target sequence of investigated DNA and confirmed the presence of polymorphisms in the studied loci (606 and 612). Reproductive parameters were date of birth of studied animal and dates of all her lambing records. Season of birth and seasons of lambings were calculated on the basis of date of birth and dates of lambings. Date of birth and date of first lambing were used to determine length of interval (in days) required for animal to have first offspring. Dates of subsequent lambings were used to calculate the average interval between lambing. For genotype effects estimation on first lambing on loci 606 and

612 the following linear model was used: $Y1_{ijklm} = \mu + tr_i + sr_j + p_k + G_l + e_{ijklm}$. For genotype effects estimation on interval between lambing on loci 606 and 612 the following linear model was used: $Y2_{ijklmn} = \beta_0 + \beta_1 x_{ijklmn} + tr_i + sr_j + p_k + G_l + e_{ijklmn}$. Considering the length of restriction fragments observed on agarose gel under UV light all three genotypes were detected at locus 606 and 612 of the MTNR1A gene in studied populations. Genotype frequencies at locus 606 were: 0.26, 0.45 and 0.29 for CC, CT and TT, respectively. Genotype frequencies at locus 612 were: 0.46, 0.39 and 0.15 for GG, GA and AA, respectively. Allele frequencies were: 0.49 for C, 0.51 for T, 0.66 for G and 0.34 for A allele. Differences in determined genotype frequencies between mouflon and all studied sheep breeds were statistically significant at both loci ($P < 0.001$; $P < 0.05$). Also statistically significant differences in determined genotypes frequencies were found between investigated sheep breeds. High frequency of the allele C on locus 606 was determined in mouflon, Romanov and Suffolk breeds while seasonal polyestric sheep breeds had higher frequencies of allele T. The locus 612 in almost all studied sheep breeds revealed a high frequency of the allele G (0.50 to 0.95) except mouflon in which we identified a high frequency of allele A (0.93). The most frequent combinations of genotypes at position 606 and 612 were: CTGA (27.79%), TTGG (27.11% and CTGG (16.86%). The examined populations were in Hardy-Weinberg equilibrium for both loci, except for locus 612 in Bovec sheep ($P < 0.01$) and on both loci (606 and 612) in Dubrovnik sheep ($P < 0.01$). The polymorphism at locus 606 was expressed by the presence of cytosine (C allele) instead of thymine (T allele), while polymorphisms at loci 612 was expressed by the presence of guanine (G allele) instead of adenine (A allele). Except those two mutations another six mutations were detected at the investigated DNA sequence. Those six mutations were: G453T, G706A, G783, G801, C891T and C893A. The mutation in position G706A and C893A led to an amino acid change in position 220 and 282, while all other mutations were silent. Sheep lambing were recorded in all four seasons, and regardless of genotype the highest number of lambing was recorded in winter (61.89%). Although out of season (summer and fall) was recorded only 11% of lambing, ewes with homozygous (CC/606; GG/612) and heterozygous (CT/606; GA/612) genotype dominated. In spring lambing dominated genotype combination CTGA (32.37%), in summer genotypes CCGG, CTGG CTGA with 25% each, in fall genotypes TTGG and CTGA and in winter genotypes CTGA and TTGG. Age of first lambing regarding genotype at position 606 was very uniform from 513.8 days in genotype CC to 519 days in genotype TT. On the other side at position 612 animals with genotype AA needed 434.9 days to first lambing, animals with GG genotype 525.1 days and GA genotype 521.6 days. Differences between genotypes on both loci were not statistically significant. Combination CTAA had the most favourable effect on lower age at first lambing. Individuals with mentioned genotype lambed with average age of 375.5 days while individuals with CCGG genotype were the oldest at first lambing with 587.9 days. Average interval between lambing in observed genotypes were as follow: 360.4, 358.5 and 361.3 days in CC, CT and TT genotype and 359.3, 360.7 and 356.6 days in GG, GA and AA genotype, respectively. Differences between genotypes on both loci were not statistically significant. Combination of genotypes TTAA had the smallest interval between lambing of 352.3 days while genotype combination TTGA had the biggest lambing interval (394.1 days). In the end we can conclude that polymorphisms at loci 606 and 612 of MTNR1A gene were observed in studied populations. Despite the absence of statistically significant effect of genotypes at loci 606 and 612 on studied parameters some positive effect of MTNR1A gene polymorphisms in some sheep breeds were observed.

Key words: seasonal reproduction, sheep, breed, MTNR1A gene locus 606 and 612, *RsaI*/*MnII* restriction endonuclease, polymorphisms, genotypes

Sadržaj

Popis kratica-----	I
Popis tablica-----	III
Popis grafikona -----	V
Popis slika-----	VII
Popis priloga-----	VIII
1. UVOD-----	1
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja -----	2
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA-----	4
2.1. Pasmine ovaca i njihove reprodukcijske odlike-----	4
2.1.1. Bovška ovca-----	5
2.1.2. Cigaja -----	5
2.1.3. Dalmatinska pramenka -----	6
2.1.4. Dubrovačka ovca-----	6
2.1.5. Istarska ovca -----	7
2.1.6. Istočnofrizijska ovca -----	7
2.1.7. Lička pramenka-----	8
2.1.8. Paška ovca -----	8
2.1.9. Romanovska ovca -----	8
2.1.10. Suffolk-----	9
2.1.11. Europski muflon (<i>Ovis musimon</i>) -----	9
2.2. Spolni organi ovce-----	10
2.2.1. Jajnici (<i>ovarium</i>)-----	10
2.2.2. Jajovodi (<i>tuba uterina</i>) -----	11
2.2.3. Maternica (<i>uterus</i>)-----	12
2.2.4. Rodnica (<i>vagina</i>) i stidnica (<i>vulva</i>) -----	12
2.3. Spolna zrelost ovaca -----	13
2.4. Spolni ciklus ovaca-----	15
2.4.1. Proestrus (<i>proestrus</i>)-----	16
2.4.2. Estrus (<i>oestrus</i>)-----	16
2.4.3. Metestrus (<i>metoestrus</i>) -----	17
2.4.4. Diestrus (<i>dioestrus</i>)-----	17
2.5. Sezonska poliestričnost ovaca -----	18
2.5.1. Fotoperiod -----	19
2.5.2. Područje nastanka pasmine -----	20

2.5.3. Cirkularni ritam	22
2.5.4. Hranidba	22
2.6. Mehanizam hormonalne regulacije spolnog ciklusa ovaca	24
2.6.1. Međudjelovanje hormona tijekom estrusnog razdoblja	24
2.6.2. Međudjelovanje hormona tijekom anestrusnog razdoblja	26
2.7. Melatonin	27
2.7.1. Biosinteza melatonina	29
2.7.2. Pohrana melatonina	30
2.7.3. Sekrecija melatonina	30
2.7.4. Razgradnja melatonina	32
2.7.5. Uloga melatonina u regulaciji spolnog ciklusa ovaca	33
2.8. Receptori melatonina	35
2.8.1. Receptori vezani na G-proteine	37
2.9. Polimorfizam MTNR1A gena	38
2.9.1. Pozicija polimorfizma	38
2.9.2. Frekvencije alela i genotipova MTNR1A gena	39
2.9.3. Mutacije na drugom egzonu MTNR1A gena	42
3. MATERIJAL I METODE RADA	44
3.1. Biološki materijal	44
3.2. Reprodukcijski pokazatelji	45
3.3. Izolacija genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNK)	46
3.3.1. Postupak izolacije DNK iz dlake	46
3.3.2. Postupak izolacije DNK iz krvi	48
3.3.3. Postupak izolacije DNK iz tkiva	48
3.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	48
3.5. Determinacija polimorfizama MTNR1A gena	50
3.6. Određivanje slijeda nukleotida	52
3.7. Statistička obrada podataka	54
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	56
4.1. Reprodukcijski pokazatelji istraživanih životinja	56
4.1.1. Sezona rođenja	56
4.1.2. Tip rođenja	59
4.1.3. Sezona janjenja	60
4.2. Frekvencije alela i genotipova MTNR1A gena	62
4.3. Slijed nukleotida drugog egzona MTNR1A gena	75
4.4. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na sezonu janjenja	77

4.5. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju-----	86
4.6. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja-----	96
5. RASPRAVA -----	107
5.1. Distribucija sezona janjenja pojedinih pasmina ovaca-----	107
5.2. Frekvencije alela i genotipova MTNR1A gena-----	109
5.3. Varijabilnost nukleotidnog slijeda MTNR1A gena ovaca-----	114
5.4. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na sezonsku poliestričnost-----	115
5.5. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju-----	118
5.6. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na dužinu međujanjidbenog razdoblja ----	119
6. ZAKLJUČCI -----	121
7. POPIS LITERATURE -----	123
8. ŽIVOTOPIS-----	139
9. PRILOZI -----	142

Popis kratica

ATP – adenozin trifosfat

Bo – bovška ovca

bp – bazni par

cAMP – ciklički adenozin monofosfat

Ci – cigaja

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

Do – dubrovačka ovca

Dp – dalmatinska pramenka

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina

FSH – folikulostimulirajući hormon

genotip AA – homozigot na lokusu 612 MTNR1A gena

genotip CC – homozigot na lokusu 606 MTNR1A gena

genotip CT – heterozigot na lokusu 606 MTNR1A gena

genotip GA – heterozigot na lokusu 612 MTNR1A gena

genotip GG – homozigot na lokusu 612 MTNR1A gena

genotip TT – homozigot na lokusu 606 MTNR1a gena

GMM – German Mutton Merino

GnRH – gonadotropin otpuštajući hormon

GPCR – G-proteinski receptor (engl. *G protein-coupled receptor*)

GTP – gvanozin trifosfat

Io – istarska ovca

Ifo – istočnofrizijska ovca

L – lokus

L 606 – lokus na poziciji 606 istraživanog odsječka DNK

L 612 – lokus na poziciji 612 istraživanog odsječka DNK

LH – luteinizirajući hormon

Lp – lička pramenka

mg - miligram

mL - mililitar

MT1 – melatonin receptor 1

MT2 – melatonin receptor 2

MTNR1A – melatonin receptor 1A gen

Mu – muflon

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

pg/mL – pikograma po mililitru

Po – paška ovca

RA – Rasa Aragonesa

rcf – relativna sila centrifuge (engl. *Relative Centrifugal Force*) ili G-sila

RFLP – polimorfizam dužine restrikcijskog fragmenta (engl. *Restriction fragment length polymorphism*)

rpm – broj okretaja u minuti (engl. *Revolutions per minute*)

Ro – romanovska ovca

Sf – Suffolk

SNP – točkasta mutacija (engl. *Single-nucleotide polymorphism*)

STH – Small Tail Han

TE pufer – tris EDTA pufer

UV svjetlo – ultraljubičasto svjetlo

μL – mikrolitar

V - volt

Popis tablica

Tablica 1. Frekvencije alela i genotipova na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena ovaca	41
Tablica 2. Pozicije mutacija te promjene baza i aminokiselina MTNR1A gena ovaca (Pelletier i sur., 2000)	43
Tablica 3. Broj uzoraka i lokacija po istraživanoj populaciji	44
Tablica 4. Reakcijski miks za RsaI i MnlI restriksijsku endonukleazu	50
Tablica 5. Genotipizacija uzoraka na temelju polimorfizama MTNR1A gena	50
Tablica 6. Broj sekvenciranih genotipova po pojedinoj istraživanoj pasmini	52
Tablica 7. Korišteni miksevi za pročišćavanje sekvence DNK prije sekvenciranja	53
Tablica 8. Broj i udio ovaca rođenih po sezonama s obzirom na pasminu	58
Tablica 9. Broj i udio istraživanih ovaca rođenih u pojedinim mjesecima od 2001. do 2013. godine	59
Tablica 10. Tip rođenja istraživanih ovaca s obzirom na pasminu	60
Tablica 11. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na pasminu	62
Tablica 12. Pojedinačni i zbirni prikaz broja i udjela kombinacija genotipova na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena ovaca	64
Tablica 13. Utvrđene frekvencije alela i genotipova MTNR1A gena na lokusu 606	66
Tablica 14. Utvrđene frekvencije alela i genotipova MTNR1A gena na lokusu 612	68
Tablica 15. Testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže genotipova muflona i deset populacija ovaca na lokusima 606 i 612 MTNR1A gena	68
Tablica 16. Razlike između utvrđenih genotipova na lokusu 606 između muflona i deset pasmina ovaca	70
Tablica 17. Razlike između utvrđenih genotipova na lokusu 612 između muflona i deset pasmina ovaca	72
Tablica 18. Utvrđen broj i udio pojedine kombinacije genotipova s obzirom na prisutnost ili izostanak polimorfizma na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena	74
Tablica 19. Pozicije mutacija te promjene baza i aminokiselina na istraživanom odsječku DNK drugog egzona MTNR1A gena	76
Tablica 20. Utvrđene mutacije na istraživanom odsječku DNK drugog egzona MTNR1A gena s obzirom na genotip na lokusu 612	77
Tablica 21. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena	78
Tablica 22. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena	80
Tablica 23. Distribucija janjenja po sezonama s obzirom na polimorfizam na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena	81
Tablica 24. Ukupan broj i udio janjenja po sezonama istraživanih pasmina ovaca s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena	82
Tablica 25. Ukupan broj i udio janjenja po sezonama istraživanih pasmina ovaca s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena	84
Tablica 26. Opisna statistika dobi ovaca pri prvom janjenju s obzirom na polimorfizam na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena	87
Tablica 27. Utjecaj polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju (LSMEANS ± SE)	87

Tablica 28. Opisna statistika kombinacije polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju	88
Tablica 29. Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 606 MTNR1A gena.....	90
Tablica 30. Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 606 MTNR1A gena.....	92
Tablica 31. Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena.....	94
Tablica 32. Opisna statistika prosječne dužine međujanjidbenog razdoblja ovaca s obzirom na polimorfizam na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena.....	97
Tablica 33. Utjecaj polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja.....	97
Tablica 34. Opisna statistika kombinacije polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja (dana).....	98
Tablica 35. Prosječne dužine međujanjidbenog razdoblja s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 606 MTNR1A gena.....	100
Tablica 36. Prosječne dužine međujanjidbenog razdoblja s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 612 MTNR1A gena.....	102
Tablica 37. Prosječna dužina međujanjidbenog razdoblja s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena.....	104

Popis grafikona

Grafikon 1. Udio ovaca rođenih po sezonama.....	56
Grafikon 2. Udio ovaca rođenih po sezonama s obzirom na pasminu	57
Grafikon 3. Udio ovaca rođenih po mjesecima	58
Grafikon 4. Udio ovaca rođenih kao samac i kao blizanac	59
Grafikon 5. Udio janjenja ovaca po sezonama	61
Grafikon 6. Udio janjenja ovaca po sezonama s obzirom na pasminu.....	61
Grafikon 7. Distribucija genotipova na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena.....	63
Grafikon 8. Frekvencije alela na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena.....	63
Grafikon 9. Frekvencija pojedinih kombinacija genotipova s obzirom na lokus 606 i lokus 612 MTNR1A gena	64
Grafikon 10. Frekvencije genotipova na lokusu 606 MTNR1A gena istraživanih populacija	65
Grafikon 11. Frekvencije alela na lokusu 606 MTNR1A gena istraživanih populacija	65
Grafikon 12. Frekvencija genotipova na lokusu 612 MTNR1A gena istraživanih populacija	67
Grafikon 13. Frekvencije alela na lokusu 612 MTNR1A gena istraživanih populacija	67
Grafikon 14. Udio kombinacija genotipova na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena muflona i 10 pasmina ovaca	73
Grafikon 15. Distribucija janjenja ovaca s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena.....	78
Grafikon 16. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena	79
Grafikon 17. Distribucija janjenja ovaca s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena.....	79
Grafikon 18. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena	80
Grafikon 19. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na kombinaciju genotipova na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena	81
Grafikon 20. Utjecaj polimorfizma MTNR1A gena na lokusu 606 i 612 na dob ovaca pri prvom janjenju	86
Grafikon 21. Utjecaj kombinacije genotipova na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju.....	88
Grafikon 22. Dob ovaca pri prvom janjenju po pasminama s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena.....	89
Grafikon 23. Dob ovaca pri prvom janjenju po pasminama s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena.....	91
Grafikon 24. Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena.....	93
Grafikon 25. Dužina međujanjidbenog razdoblja ovaca s obzirom na genotip na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena.....	96
Grafikon 26. Dužina međujanjidbenog razdoblja ovaca s obzirom na kombinaciju genotipova na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena.....	98
Grafikon 27. Dužina međujanjidbenog razdoblja ovaca s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 606 MTNR1A gena	99

Grafikon 28. Dužina međujanjidbenog razdoblja ovaca s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 612 MTNR1A gena	101
Grafikon 29. Prosječna dužina međujanjidbenog razdoblja ovaca s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena.....	103

Popis slika

Slika 1. Oznake klimatskih zona s obzirom na dužinu pripusne sezone ovaca.....	21
Slika 2. Estrusna aktivnost i stupanj ovulacije u ovaca držanih na dvije konstantne razine tjelesne kondicije tijekom godine (ovce kondicije 2,8 – ispunjeni stupići i ▲; ovce kondicije 2,3 – prazni stupići i ■; Forcada i sur., 1992)	23
Slika 3. Cirkulirajuća razina glavnih hormona jajnika i hipofize tijekom spolnog (estrusnog) ciklusa ovaca (Scaramuzzi i sur., 1993)	25
Slika 4. Struktura molekule melatonina (Hardeland i sur., 2006)	27
Slika 5. Djelovanja melatonina u sisavaca (Reiter i sur., 2014)	28
Slika 6. Sinteza melatonina (Karasek i Winczyk, 2006).....	29
Slika 7. Dužina sekrecije melatonina ovisno o promjeni fotoperioda u ovaca (Arendt, 1998)	31
Slika 8. Cirkadijani profil koncentracije melatonina u serumu ljudi (Karasek i Winczyk, 2006).....	31
Slika 9. Razgradnja melatonina (Karasek i Winczyk, 2006).....	32
Slika 10. Membranska topologija ljudskog MT1 receptora. Plava boja označava aminokiseline identične za sva tri podtipa receptora (Reppert i Weaver, 1995) .	36
Slika 11. Ulazak melatonina u stanicu pomoću MT1 i MT2 melatoninskih receptora. MT1/MT2 – melatoninski receptori; $\beta\alpha\gamma$ – podjedinice G-proteinskog receptora; AC - enzim adenilat ciklaza; GTP – gvanozin trifosfat; ATP – adenozin trifosfat; cAMP – ciklički adenozin monofosfat (izvor: http://www.egbeck.de/melatde.htm)	38
Slika 12. Smještaj MTNR1A gena na 26. kromosomu ovce	39
Slika 13. Shematski prikaz ovčjeg MTNR1A gena s pozicijama polimorfizama označenih strelicama (Martínez-Royo i sur., 2012).....	39
Slika 14. Područja prikupljanja uzoraka muflona i pasmina ovaca uzgajanih u Republici Hrvatskoj	45
Slika 15. Amplifikacija drugog egzona MTNR1A gena duljine 824 parova baza (pb) lančanom reakcijom polimeraze (PCR) u ovaca. M – standard razmaka 100 pb, 1-22 – PCR amplificirani produkt.	49
Slika 16. Gel elektroforeza restrikcijske razgradnje PCR produkta MTNR1A gena ovaca s s RsaI restrikcijskom endonukleazom i primjer dobivenih genotipova (CC, CT, TT). M – standard razmaka 100 baznih parova; 1 -12 – oznake uzoraka.	51
Slika 17. Gel elektroforeza restrikcijske razgradnje PCR produkta MTNR1A gena ovaca s s MnlI restrikcijskom endonukleazom i primjer dobivenih genotipova (GG, GA, AA). M – standard razmaka 50 baznih parova; 1 -12 – oznake uzoraka.	51
Slika 18. Prikaz odsječka slijeda nukleotida drugog egzona MTNR1A gena s označenim pozicijama polimorfizama; a) lokus 606 – homozigot CC, lokus 612 – homozigot AA; b) lokus 606 –homozigot TT, lokus 612 –homozigot GG; c) lokus 606 – heterozigot (CT), lokus 612 – heterozigot (GA)	76

Popis priloga

Prilog 1. Slike istraživanih populacija	142
Prilog 2. Slijed nukleotida referentne sekvence U14109 drugog egzona MTNR1A gena ovaca dužine 1 150 nukleotida	146
Prilog 3. Slijedovi nukleotida istraživanih populacija	147
Prilog 4. Poravnati slijedovi nukleotida istraživanih populacija (2.-43.) s referentnim nukleotidnim slijedom U14109 (1.)	149

1. UVOD

Poznato je da su ovce (*Ovis aries*), uz koze (*Capra hircus*), pripitomljene prije 11.000 godina na području Bliskog Istoka, točnije u blizini regije poznate kao Plodni polumjesec (Zeder, 2008). Obje navedene vrste bile su jedne od najranijih pripitomljenih životinjskih vrsta (Scherf, 2000; Vigne, 2011) stoga su imale važnu ulogu u razvoju društva te se rasprostranile širom svijeta sljedeći migracije ljudi (Colledge i sur., 2005). Danas su ovce zastupljene na svim naseljenim kontinentima i jedna su od najraširenijih vrsta domaćih životinja. Širokoj rasprostranjenosti ovaca pogodovala je njihova svestranost u pogledu proizvodnje više proizvoda (meso, mlijeko, vuna, krzno, koža i dr.), dobra prilagodljivost različitim uvjetima okoliša te dobro iskorištavanje oskudnije vegetacije koja ograničava uzgoj krupnije stoke.

Ovčarstvo je važna gospodarska grana u mnogim zemljama (ponajviše Africi i Aziji) u kojima je njihov ekstenzivan način uzgoja najzastupljeniji, a ovce su, uz koze jedna od najbrojnijih vrsta domaćih životinja (FAO, 2015). Nasuprot navedenom, u razvijenim zemljama u kojima dominira intenzivna proizvodnja, temeljne stočarske grane su govedarstvo, svinjogojstvo i peradarstvo. Slabija zastupljenost ovaca u intenzivnim sustavima proizvodnje posljedica je sezonalnosti reprodukcije većine pasmina. Pojava sezonske reprodukcije ovaca osobito je izražena u područjima umjerenog klimatskog pojasa što nije odlika goveda i svinja u kojih se reproduksijska aktivnost odvija tijekom cijele godine. Sezonske promjene u razdoblju spolne aktivnosti (estrus) i spolne neaktivnosti (anestrus) važan su čimbenik koji utječe na učinkovitost ovčarske proizvodnje, bez obzira je li temeljna namjena stoke proizvodnja mlijeka ili mesa. Izrazita sezonalnost većine pasmina ovaca uzgajanih u Hrvatskoj uvjetuje neravnomjernu ponudu ovčjeg mesa i mlijeka na tržištu. Najviše ovčjih proizvoda u obliku mlade janjetine i svježeg mlijeka dostupno je u razdoblju od ožujka do kolovoza, dok u ostalim dijelovima godine navedeni proizvodi nisu dostupni u svježem stanju većini potrošača.

U području umjerenog klimatskog pojasa fotoperiod je glavni okolišni čimbenik koji određuje početak i trajanje pripusne sezone u ovaca (Malpaux i sur., 1996). Stoga su ovce u navedenom području sezonski poliestrične životinje koje se tjeraju u jesen (kao posljedica smanjenja dnevnog svjetla), a janje u proljeće (engl. “*short day breeder*”). Reprodukcijska aktivnost regulirana je različitim stupnjem sekrecije hormona melatonina, čija je sekrecija kontrolirana izmjenama dana i noći, odnosno fotoperiodom. Drugim riječima, duljina sekrecije melatonina je pozitivno korelirana s duljinom trajanja mraka (Karsch i sur., 1984), stoga u ovaca kratak fotoperiod, koji odgovara visokoj sekreciji melatonina, pozitivno utječe na pulsartornu sekreciju gonadotropin otpuštajućeg hormona

(GnRH) iz hipotalamusa te posljedično luteinizirajućeg hormona (LH; Malpaux i sur., 1989). Rezultat navedene kaskadne reakcije je uspostava cikličke aktivnosti na jajnicima i pojava estrusa (spolnog žara).

Na ciljna tkiva i organe melatonin djeluje putem dva specifična G-proteinska receptora MT1 i MT2 koji pokazuju visoki afinitet za njegovo vezanje, od kojih je samo MT1 receptor uključen u regulaciju reproduktivne aktivnosti (Mura i sur., 2010).

Reduciranje sezonalnosti reprodukcije ovaca često je značajan financijski izdatak i mnogi su naponi usredotočeni prema unapređenju izvansezonske reprodukcije. Problemi se očituju niskim procijenjenim heritabilitetom za svojstvo plodnosti u proljetnim i ljetnim parenjima, svojstvo je izraženo tek u kasnijoj životnoj dobi, podatci o plodnosti su uglavnom utvrđeni samo na jednom spolu (ženskom), svojstvo je izraženo samo u nekim sezonama janjenja i sustavima uzgoja što uvelike otežava genetski napredak primjenom konvencionalnih selekcijskih metoda (Notter i Cockett, 2005). Stoga je jedan od načina za smanjenje utjecaja sezonalnosti reprodukcije razvijanje selekcijskih programa putem genetskih markera. Za razvoj selekcijskih programa putem markera potrebno je detektirati odgovorne alele, odnosno genotipove koji utječu na izvansezonsku pojavu estrusa. Primjena metoda genotipizacije te odabiranje poželjnih genotipova omogućila bi formiranje populacija ovaca koje bi imale mogućost kontinuiranog spontanog tjeranja tijekom cijele godine.

Jedan od kandidat gena je MTNR1A gen koji kodira ovčji MT1 receptor. S obzirom da je MTNR1A gen visoko polimorfan na drugom egzonu obećavajući je kandidat za uporabu u selekciji putem markera za poboljšanje izvansezonske pojave estrusa u ovaca. Stoga je cilj ovog rada utvrditi utjecaj polimorfizama na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena na sezonsku poliestričnost, dob pri prvom janjenju i dužinu međujanjidbenog razdoblja.

1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Temeljem saznanja proisteklih iz dosadašnjih istraživanja utjecaja MTNR1A gena na sezonsku poliestričnost pasmina ovaca, dob pri prvom janjenju i dužinu međujanjidbenog razdoblja, postavljene se sljedeće hipoteze:

- poliestričnim pasminama ovaca (romanovska, istočnofrizijska) svojstvene su veće frekvencije C i G alela (C/606 i G/612), dok sezonski poliestrične pasmine (pramenke) i muflon imaju veće frekvencije T i A alela (T/606 i A/612);
- prisutnost genotipova CC/606 i GG/612 povoljno utječe na pojavu cjelogodišnje poliestričnosti, smanjenje dobi pri prvom janjenju te na skraćivanje međujanjidbenog razdoblja.

U suglasju s postavljenim hipotezama zadani su sljedeći ciljevi istraživanja:

- utvrditi frekvencije genotipova i alelnih varijanti MTNR1A gena na pozicijama 606 i 612 referentne sekvence U14109;
- utvrditi prisutnost polimorfizama na istraživanoj sekvenci drugog egzona MTNR1A gena;
- utvrditi utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na sezonsku poliestričnost, dob ovaca pri prvom janjenju i dužinu međujanjidbenog razdoblja.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Pasmine ovaca i njihove reprodukcijske odlike

Ovce (*Ovis aries*) jedna su od prvih pripitomljenih vrsta domaćih životinja. Arheološki nalazi upućuju na postojanje dva nezavisna područja pripitomljavanja ovaca u Turskoj, u gornjoj dolini rijeke Eufrata i u središnjoj Anatoliji (Peters i sur., 1999). Smatra se da je pripitomljavanje obuhvaćalo najmanje tri različita podtipa divljeg muflona (*Ovis gmelini*). Zeuner (1963) smatra da je prva linija pripitomljavanja obuhvaćala urial ovcu (*Ovis vignei*) koja je prvotno pripitomljena u Aral Kaspijskom bazenu te je zatim preko Bliskog Istoka stigla u Europu. Druga linija pripitomljene ovce vuče podrijetlo od muflona (*Ovis musimon* ili *Ovis orientalis*) koji je doveden u Europu i križan s ovcima podrijetlom od urial ovce. Argali ovca (*Ovis ammon*) čini treću liniju za koju se smatra da je u više navrata introducirana u navedene pripitomljene linije ovaca (Zeuner, 1963; Hiendleder i sur., 1998). Međutim, Ryder (1984) navodi da su moderne pasmine ovaca prvotno pripitomljene od azijskog muflona (*Ovis orientalis*). Od divljih predaka dugotrajnim pripitomljavanjem, primjenom prirodne i/ili umjetne selekcije nastalo je 1 400 pasmina ovaca od divljih predaka putem dugoročne prirodne i intenzivne umjetne selekcije (Scherf, 2000). Velik broj različitih tipova i pasmina ovaca međusobno se razlikuju po vanjštini, proizvodnim odlikama (meso, mlijeko, vuna, krzno, ...), ponašanju, zahtjevima i hranidbenim potrebama te prilagodljivosti i otpornosti. Tijekom povijesti, uslijed djelovanja čovjeka i vanjskih čimbenika, mijenjala se ne samo vanjšina ovaca, već i njihove fiziološke funkcije (Mioč i sur., 2007a).

Divlje pretke današnjih populacija ovaca, kao i druge divlje životinje, karakterizira sezonska pojava reprodukcijske aktivnosti, što je kao osobina preneseno i na neke sadašnje pasmine ovaca, prvenstveno one koje se uzgajaju u područjima umjerenog klimatskog pojasa. Iako je od pripitomljavanja prvih ovaca prošlo više od 10 tisuća godina, sezonska pojava reprodukcijske aktivnosti u ovaca zadržana je do danas. Sa sezonskom reprodukcijom dolazi do neravnomjerne ponude proizvoda tijekom godine, premda je pripitomljavanje općenito reduciralo sezonost reprodukcije u odnosu na divlje srodnike (Ortavant i sur., 1985). Sezonska dostupnost proizvoda osobito je izražena u pasmina nastalih u područjima umjerenog klimatskog pojasa, dok su na područjima tropske i suptropske klime ovce spolno aktivne tijekom cijele godine. Međutim, iznimku od ovog pravila čine pasmine poput Dorset Horn i romanovske ovce koje su poliestrične i u uvjetima kontinentalne klime, a ne samo u područjima tropskog i suptropskog pojasa što

je dokaz da osim fotoperioda i genetski čimbenik ima utjecaj na sezonosti ovaca (Hafez, 1952).

U nastavku ovog poglavlja ukratko će biti opisane pasmine ovaca čija je DNK korištena u izradi doktorskog rada te europski muflon (*Ovis musimon*) kao izvorni predak današnjih populacija ovaca.

2.1.1. Bovška ovca

Bovška ovca (prilog 1.) je slovenska autohtona pasmina nastala u gornjoj dolini rijeke Soče (Kompan i sur., 1996). Ime je dobila po gradu Bovec, dok je u dolini Trenta nazivaju „trentarka“ ovca. Primarno je namijenjena proizvodnji mlijeka koje po tradiciji prerađuju u zaštićeni „bovški sir“ (Bojkovski i sur., 2014). Pretpostavlja se da bovška ovca vuče korijene od primarno bijelih ovaca uzgajanih u Alpama te da je nastala križanjem mliječnih i vunskih pasmina (Novak, 1970). Ovce i ovnovi su bez rogova, rep je srednje dug, visine grebena 55 - 60 cm i tjelesne mase ovaca od 35 do 40 kg, a ovnova od 45 do 50. Kao i u većine autohtonih pasmina, temeljne odlike bovške ovce su otpornost i prilagodljivost lošijoj hranidbi i proizvodnim uvjetima. Ovce su sezonski poliestrične i janje se jednom godišnje (Bojkovski i sur., 2014), a veličina legla iznosi od 1,4 do 1,5 janjadi. Bovšku ovcu odlikuje i dobra mliječnost, tako u laktaciji od oko 220 dana proizvede oko 221 kg mlijeka sa 6,3% mliječne masti i 5,5% proteina, dok u boljim stadima proizvodnja može biti i viša od 300 kg (Kompan i sur., 2008). Procijenjena veličina populacija bovške ovce u Sloveniji 2015. godine bila je 3 300 grla (EFABIS, 2015; <http://efabis.tzv.fal.de/>). Iz veličine populacije zamjetan je stabilan trend u uzgoju i uključena je u programe očuvanja pasmine (pohranjeno je 543 doze sjemena u banku gena; <http://efabis.tzv.fal.de/>).

2.1.2. Cigaja

Cigaja je jedna od najstarijih pasmina ovaca u svijetu, a procjenjuje se da je nastala oko 800. godine prije Krista u Maloj Aziji, odakle je dopremljena u jugoistočnu Europu. Prilagođena je životu na ravničarskim pašnjacima i u Hrvatskoj ima regionalni značaj vezan uz područje Slavonije i Baranje (Mioč i sur., 2007a; Caput i sur., 2010). Najkrupnija je hrvatska autohtona pasmina (prilog 1.), snažne konstitucije te se isključivo uzgaja radi proizvodnje mesa. Visina do grebena ovaca je 74 cm, ovnova 80 cm, dužina trupa 83 cm u ovaca, odnosno 91 cm u ovnova, dok tjelesna masa ovaca varira u rasponu od 60 do 80 kg, a ovnova od 80 do 100 kg (Vrdoljak i sur., 2007). Prema dostupnim reprodukcijskim pokazateljima indeks janjenja cigaje je 1,01, dok je prosječna veličina legla 1,07 janjadi. Ovce se većinom janje u prvoj polovici godine, iako je značajan udio janjenja evidentiran u kolovozu i rujnu (HPA, 2016). Prema podacima Hrvatske

poljoprivredne agencije (HPA) za 2015. najveći postotak janjenja evidentiran je u veljači (24,25%), zatim svibnju (17,94%), rujnu (16,61%), lipnju (11,63%) i kolovozu (10,30%; HPA, 2016). Procjenjuje se da se u Hrvatskoj uzgaja oko 3 000 ovaca pasmine cigaja od kojih je 1 330 grla uzgojno valjano (HPA, 2016). Pasma je obuhvaćena programom zaštite te je iz veličine populacije zamjetan stabilan trend (<http://efabis.tzv.fal.de/>).

2.1.3. Dalmatinska pramenka

Pretpostavlja se da je filogeneza dalmatinske pramenke vezana za druge pasmine iz skupine pramenki sa šireg područja (Balkanski poluotok, Mađarska, Ukrajina i Moldavija). Dalmatinska pramenka (prilog 1.) je najbrojnija hrvatska autohtona pasmina ovaca koju se uzgaja na širem priobalnom području Dalmacije, u Dalmatinskoj zagori, Bukovici te na otocima Braču, Hvaru, Visu i Kornatima (Mioč i sur., 2007a; Caput i sur., 2010). Sa svrhom povećanja proizvodne učinkovitosti bila je izložena utjecaju različitih genotipova. Pripada skupini kasnozrelih pasmina ovaca kombiniranih proizvodnih odlika iako ju se najčešće koristi za proizvodnju mesa. Prosječna tjelesna masa odraslih ovaca - ovnova je od 39 do 50 kg, dok je visina grebena ovaca 58 cm (Širić i sur., 2009). Prosječni indeks janjenja ovaca dalmatinske pramenke je 1,01, dok je prosječna veličina legla 1,03 janjadi. Sezonski je poliestrična pasmina s izraženom distribucijom janjenja tijekom zime i proljeća i to: siječanj (36,94%), veljača (23,56%), ožujak (14,25%), travanj (7,79%) i prosinac (11,65%; HPA, 2016). Procijenjena veličina populacije je oko 280 000 grla, a od toga je 11 228 grla evidentirano kao uzgojno valjano i obuhvaćeno je matičnom evidencijom.

2.1.4. Dubrovačka ovca

Dubrovačka ovca (ruda; prilog 1.) je pasmina isključivo regionalne važnosti vezanog uz područje Imotice i Konavala. Nastala je višestoljetnom povremenom merinizacijom lokalne populacije pramenki ovnovima iz Italije, Francuske, Portugala i Španjolske (Mioč i sur., 2007a; Caput i sur., 2010). Ovce su prosječne tjelesne mase do 45 kg, a ovnovi do 60 kg, dok je visina grebena ovaca oko 60 cm (Mioč i sur., 2003). Neznatno je manjeg indeksa janjenja (1,00) i veličine legla (1,03 janjadi). Janjenje ovaca odvija se uglavnom tijekom zime i to: siječanj (27,52%), veljača (23,85%), ožujak (24,31%) i prosinac (3,67%; HPA, 2016). S ukupnim brojem uzgojno valjanih grla od 727 jedinki, dubrovačka ovca spada u skupnu kritično ugroženih pasmina, a posljednjih godina populacija pokazuje stabilan trend (<http://efabis.tzv.fal.de/>).

2.1.5. Istarska ovca

Istarska ovca nastala je na Istarskom poluotoku s ciljnim povremenim djelovanjem različitih inozemnih pasmina na lokalnu populaciju ovaca, od kojih su najznačajniji utjecaj imale talijanske pasmine Gentile di Puglia i Bergamo ovca (Rako, 1957). Manje traga na populaciju istarske ovce ostavili su pokušaji merinizacije dijela populacije u vrijeme austrougarske države (Jardas, 1984). Istarska ovca je nešto krupniji, dugorepi tip mediteranske ovce (prilog 1.) s prosječnom visinom do grebena ovaca od 73,51 cm, a ovnova od 78,06 cm. Tjelesna masa ovaca od 70 do 75 kg, a ovnova 70 - 100 kg (Mioč i sur., 2007b). Odlikuje je izvrstan genetski potencijal za proizvodnju mlijeka, a u laktaciji od 180 do 200 dana proizvede oko 200 litara mlijeka te je najmlječnija hrvatska autohtona pasmina ovaca. Kao i u ostalih autohtonim pasmina ovaca, indeks janjenja istarske ovce iznosi 1,04, a veličina legla 1,04 janjadi (HPA, 2016). Janjenje ovaca odvija se tijekom kasne jeseni i zime kako slijedi: siječanj (23,17%), veljača (19,10%), ožujak (9,58%), studeni (17,72%) i prosinac (20,16%; HPA, 2016). Sva populacija istarske ovce od 1 943 grla je uzgojno valjana i obuhvaćena je u programom očuvanja pasmine. Populacija je posljednjih deset godina pokazivala stabilan trend, međutim 2015. godine je uočeno smanjivanje broja jedinki istarske ovce (<http://efabis.tzv.fal.de/>).

2.1.6. Istočnofrizijska ovca

Istočnofrizijska ovca (engl. *East Friesian*) spada među najstarije pasmine ovaca u svijetu, a prvi puta ju se spominje 1530. godine u Vatikanskim arhivima. Ime je dobila po istoimenoj pokrajini Ostfriesland, koja se proteže uzduž obale Sjevernog mora na granici između Njemačke i Nizozemske, u kojoj je nastala (Caput i sur., 2010). Jedna je od najmlječnijih i najplodnijih pasmina ovaca u svijetu. Prepoznatljiva je po repu i dijelu sjedne kosti koji nisu obrasli vunom nego dlakom (prilog 1.). Pripada skupini ranozrelih pasmina, a spolno dozrijeva u dobi od oko sedam mjeseci (Ward i Williams, 1993). Istočnofrizijske ovce u Hrvatskoj u laktaciji od 221 dan proizvede prosječno 364,65 kg mlijeka sa 5,68% masti, 4,92% bjelančevina i 4,59% laktoze (Mioč i sur., 2004). Janjenje ovaca se odvija tijekom zime i početka proljeća i to u: siječnju (8,59%), veljači (38,23%), ožujku (30,47%) i u travnju (11,08%). Prosječni indeks janjenja istočnofrizijske ovce u Hrvatskoj je 1,11, a prosječna veličina legla 1,10 janjadi (HPA, 2016). Posljednjih godina zamjetno je smanjenje broja uzgojno valjanih grla istočnofrizijske ovce u Hrvatskoj, te je 2015. godine evidentirano 427 jedinki (HPA, 2016).

2.1.7. Lička pramenka

Lička pramenka nastala je na prostranim, vegetacijom bogatim prirodnim pašnjacima te surovim zimskim uvjetima gorsko-planinskih područja Like i Gorskog kotara. Pripada pasminama ovaca kombiniranih proizvodnih osobina iako ju se najviše uzgaja za proizvodnju mesa (janjetine). Tijekom povijesti čistokrvnost uzgoja povremeno je bila slučajno ili sustavno ugrožavana nastojanjima njezina oplemenjivanja različitim inozemnim pasminama. Nakon Drugog svjetskog rata, tijekom procesa merinizacije lička pramenka je oplemenjivanja mesno-vunskim ovnovima iz Francuske i Njemačke (Merino Precoce, Ile de France, Merinolandschaf; Mioč i sur., 1998). Navedeni neuspjeli proces merinizacije završava posljednjim brojnijim uvozom četiriju merino genotipova iz Australije (Mioč i sur., 1998). Prosječna tjelesna masa ovaca je oko 50 kg, a ovnova od 55 do 70 kg (prilog 1.), dok je visina grebena ovaca 60 cm (Mioč i sur., 1998). Prosječni indeks janjenja je 1,01, a veličina legla 1,03. Ovce se uglavnom janje zimi i početkom proljeća: siječanj (9,54%), veljača (7,15%), ožujak (38,24%), travanj (30,52%) i prosinac (8,41%; HPA, 2016). Procijenjena veličina populacije iznosi oko 30 000 grla, dok je broj uzgojno valjanih grla 9 464 (HPA, 2016) te populacija pokazuje stabilan trend (<http://efabis.tzv.fal.de/>).

2.1.8. Paška ovca

Paška ovca je nastala u drugoj polovici 19. stoljeća oplemenjivanjem lokalne otočne pramenke s merinom. Glavni utjecaj na formiranje paške ovce imale su merino Negretti i Bergamo ovce uz presudan utjecaj okoliša (Jardas, 1951). Paška ovca najviše se uzgaja radi proizvodnje mlijeka koje se prerađuje u poznati punomasni, tvrdi ovčji – paški sir. Tjelesna masa ovaca je od 30 do 45 kg, a ovnova od 40 do 60 kg (prilog 1.). Visina grebena odraslih ovaca je oko 56 cm, a ovnova 63 cm (Pavić i sur., 2005). Paška ovca u razdoblju mužnje od 134 dana proizvede oko 105 kg mlijeka sa 7,8% masti i 6,0% bjelančevina (Caput i sur., 2010). Pasminu odlikuje prosječni indeks janjenja od 1,00 i veličina legla 1,01 janjadi (HPA, 2016). Ovce se većinom janje od studenog do veljače i to u: studenom (10,04%), prosincu (42,89%), siječnju (30,74%) i veljači (5,59%). S procijenjenom veličina populacije od oko 30 000 grla i s 5 156 uzgojno valjanih jedinki (HPA, 2016) populacija paške ovce pokazuje stabilan trend (<http://efabis.tzv.fal.de/>).

2.1.9. Romanovska ovca

Romanovska ovca nastala je u Rusiji tijekom 18. stoljeća, a ime je dobila prema gradiću Romanovu, smještenom u dolini rijeke Volge sjeverozapadno od Moskve. Odlikuje je jaka genetska sličnost sa muflonom, a nastala je dugogodišnjom selekcijom kratkorepe

Nordic pasmine (Lazovskii, 1983; cit. Fahmy, 1996). Iako pripada skupini ovaca kombiniranih proizvodnih odlika, jedna je od najplodnijih pasmina i janji jedno janje u 17% slučajeva, dvoje janjadi u 51% slučajeva, a više od dvoje janjadi u 32% slučajeva (Arsen'ev, 1973a). Prosječna tjelesna masa odraslih ovaca je od 50 do 55 kg, a ovnova od 80 do 100 kg (Arsen'ev, 1973b; prilog 1.). Ranozrela je pasmina i spolno dozrijeva u dobi od 6 do 7 mjeseci, a odlikuje je i duga sezona spolne aktivnosti (kolovoz-ožujak). Dobro hranjena grla koja dostignu tjelesnu masu 35-40 kg sa 6-8 mjeseci mogu se u toj dobi pripustiti te se prvi puta janje s godinu dana (Cornu i Cognie, 1985). U Hrvatskoj prosječni indeks janjenja romanovske ovce je 1,27, dok je veličina legla 1,52 janjadi. Janjenje ovaca se odvija tijekom cijele godine, a najfrekventnije razdoblje je od prosinca do travnja, dok su veljača (20,92%) i ožujak (19,44%) mjeseci sa evidentiranom najvećom frekvencijom janjenja (HPA, 2016). Veličina uzgojno valjane populacije u Hrvatskoj je 2 203 grla (HPA, 2016), a posljednjih godina zamjetno je konstantno smanjenje broja ovaca.

2.1.10. Suffolk

Pasmina Suffolk nastala je u istoimenoj engleskoj pokrajini križanjem slabo proizvodnih kasnozrelih rogatih Norfolk ovaca s ovnovima Sauthdaun pasmine. Zasebno prepoznatljivom pasminom postaje 1810., a ime dobiva 1859. godine (Caput i sur., 2010). Ovisno o boji dlake na glavi, trbuhu i nogama u svijetu postoje tri tipa safolka: crni, bijeli i smeđi. Odlikuje ga dobra mesna konformacija s kratkim i mišićavim vratom, dubokim i širokim prsima, ravnim i mišićavim leđima te dobro izraženim širinama i dubinama zdjeličnog područja (Caput i sur., 2010; prilog 1.). Tjelesna masa odraslih ovaca je od 70 do 100 kg, a ovnova od 120 do 135 kg (Mioč i sur., 2007a). U Hrvatskoj prosječni indeks janjenja Suffolk pasmine je 1,00, a veličina legla 1,37 janjadi (HPA, 2016). Janjenje ovaca se odvija u prvoj polovici godine i to u: veljači (8,62%), ožujku (55,17%), travnju (25,86%) i svibnju (8,62%; HPA, 2016). Broj uzgojno valjanih grla u Hrvatskoj konstantno opada, a 2015. godine su evidentirane samo 83 uzgojno valjane jedinke (HPA, 2016).

2.1.11. Europski muflon (*Ovis musimon*)

Muflon je izvorni oblik divlje ovce koja obitava na Bliskom istoku. U pretpovijesno doba bio je uveden na nekoliko mediteranskih otoka (Sardiniju, Korziku, Cipar i Rodos; Hiendleder i sur., 2002). Posljednjih stoljeća široko je rasprostranjen po mnogim planinskim regijama Europe. U prošlosti je taksonomija muflona bila zbunjujuća (Hiendleder i sur., 2002), sve do konačne klasifikacije (Wilson i Reeder, 2005) koja je

naznačila da se muflona može smatrati divljom ovcom (*Ovis aries musimon*) različitom od domaće ovce (*Ovis aries aries*), stoga su viđeni kao dvije podvrste iste vrste. Na područje Republike Hrvatske muflone prvi naseljava i pušta na svoj posjed u Novom Marafu grof Erdödi 1900. godine (Turk, 1949). Prosječna tjelesna masa odraslih muflona je 45-50 kg, a visina grebena 65-70 cm (prilog 1.). Odlikuje ga izrazito sezonska pojava estrusa, s razdobljem parenja od kolovoza do listopada. Ženke muflona uglavnom janje jedno mladunče (Mioč i sur., 2007a).

2.2. Spolni organi ovce

Spolne organe ovce (*organa genitalia feminina*) čine dva jajnika (*ovarium*), dva jajovoda (*tuba uterina*), maternica (*uterus*), rodnica (*vagina*) koja se sastoji od rodničkog predvorja (*vestibulum vagine*), stidnice (*vulva*) i dražice (*clitoris*). U navedenim organima, koji čine spolni sustav ovce, dolazi do stvaranja i sazrijevanja jajne stanice (ovulacija), oplodnje, razvoja zametka (*embrio*), kasnije fetusa te istiskivanja ploda, odnosno partusa. Za ženski spolni sustav tipično je da se na gotovo svim njegovim organima odvijaju cikličke promjene koje su u uskoj vezi s fazama spolnog ciklusa (Mioč i sur., 2007a; Rupiće, 2015).

2.2.1. Jajnici (*ovarium*)

Jajnici su parni organi u kojima nastaju jajne stanice (ženske gamete) te spolni hormoni (estrogeni i progesteron) s ciljnim mjestom djelovanja - hipotalamusno-hipofizna osovina. Ovce imaju okrugle jajnike koji mogu poprimiti oblik šljive ili badema, duge oko 1,5 cm, a teške 3 - 4 grama, smještene na prijelazu trbušne u zdjeličnu šupljinu te povezane ligamentima. Veličina i oblik jajnika su vrlo promjenjivi te se mijenjaju ovisno o fazi spolnog ciklusa i djelovanju hormona (folikul, žuto tijelo) ili pri patološkim procesima (ciste, tumori; Samardžija i sur., 2010; Rupiće, 2015).

Na jajnicima ovce razlikuju se dva sloja: vanjski, periferni, odnosno kora ili parenhimski sloj (*cortex ovarii* ili *zona parenchymatosa*) i središnji, srž ili krvožilni sloj (*medulla ovarii* ili *zona vasculosa*). Središnji sloj na hilusu (*hilus ovarii*), odnosno rubu jajnika na koji se hvata jajnički ligament, dopire na površinu (Samardžija i sur., 2010; Rupiće, 2015). U parenhimskom sloju nalaze se matični folikuli koji sadrže zametne stanice (*oogonije*) te sloj pločastih folikularnih stanica. Iz matičnog folikula nastaje primarni folikul, iz primarnog folikula nastaje sekundarni folikul koji prelazi u tercijarni ili Graafov folikul. U Graafovim folikulima jajna stanica ima haploidan broj kromosoma. Tijekom estrusa na

jajnicima se nalazi veći broj folikula od kojih jedan ili više dozrijeva i puca te biva izbačen u jajovod što se naziva ovulacija (Rupić, 2015).

Ovulacijom dolazi do oštećenja površine jajnika i krvnih žila. Nakon pucanja stjenka folikula se stegne, a iz krvnih žila curi krv i tako nastane *corpus hemorrhagicum*. Ubrzo nakon stvaranja *corpus hemorrhagicuma* stanice ispod krvnog ugruška – granuloza stanice proliferiraju i hipertrofiraju i prelaze u granuloza luteinske stanice (nalazimo velike i male luteinske stanice, u njima se stvara žuta boja – lutein vezan na mast i lipoide). One uraštaju u krvni ugrušak, ispunjavaju šupljinu puknutog folikula i množe se u velikom broju formirajući čvrsto žuto tijelo. Nakupljanjem luteina, odnosno lipoidnog pigmenta u granuloza stanicama, *corpus hemorrhagicum* prelazi u *corpus luteum* (Rupić, 2015). U ovaca je žuto tijelo promjera od 0,6 do 0,9 cm. Temeljna zadaća žutog tijela je lučenje hormona progesterona kojim u prvoj polovici gravidnosti, a ponekad i dulje, održava gravidnost, tj. plodove u maternici. Ako ženka nije koncipirala, žuto tijelo (*corpus luteum regressum s. spurium*) postupno nestaje s jajnika (dolazi do procesa regresije) koji u ovaca nastupa od 12 do 14 dana nakon ovulacije. Kada je ovca koncipirala, žuto tijelo ostaje na jajniku i tada se naziva gravidno (*corpus luteum verum s. graviditatis*) i ono lučenjem progesterona sprečava pojavu estrusa (Rupić, 2015).

2.2.2. Jajovodi (*tuba uterina*)

Jajovod je parni cjevasti, uski, vijugavi i mišićni organ u ovaca dužine od 10 do 19 cm koji se jednom stranom nalazi uz jajnik, a drugom je povezan s rogom maternice. Promjer jajovoda se od jajnika prema maternici sužava i iznosi 0,5 - 1 mm. U proširenom dijelu jajovoda (*ampula*) dolazi do oplodnje jajne stanice, dok uži dio jajovoda (*isthmus*) služi kao skladište spermatozoida i postupno prelazi u vrh roga maternice (Mioč i sur., 2007a). Zadaća jajovoda je da usiše jajnu stanicu, omogući oplodnju i provede zametke (oplođene jajne stanice) od jajnika do rogova maternice te regulira brzinu njihovog prolaza kroz jajovod. Fiziološka uloga jajovoda je održavanje spermija na životu i njihovo sprovođenje od roga maternice do ampule gdje se događa oplodnja. U jajovodu spermiji prije oplodnje jajne stanice prođu proces kapacitacije (uklanjanje glikoproteinskog omotača i bjelančevina sjemenske tekućine) bez kojega ne bi mogli oploditi jajnu stanicu. Nakon oplodnje u jajovodu se događa početni embrionalni razvoj. U ovce trajanje prolaska jajne stanice kroz jajovod nakon ovulacije iznosi je od 72 do 90 sati (Rupić, 2015), a nakon oplodnje jajna stanica (blastocista) ulazi u maternicu ovce za 3 - 4 dana (Reece, 2015).

2.2.3. Maternica (*uterus*)

Maternica je organ u kojemu se oplođena jajna stanica razvija i ostaje u njoj tijekom gravidnosti do partusa. Po tipu maternice ovca ima *uterus bicornis subseptus*, što znači da maternica ima septum (pregradu) te nije jednake veličine izvana i iznutra (Samardžija i sur., 2010). Na maternici se razlikuje tijelo maternice (*corpus uteri*), rogovi maternice (*cornua uteri*) i grljak maternice (*cervix uteri*). Rogovi maternice su najuži na mjestu spajanja s jajovodom odakle se polako proširuju i spajaju te tako čine jedinstvenu šupljinu, odnosno tijelo maternice (Rupić, 2015). Maternica je većim prednjim dijelom (rogovi i prednji dio tijela) smještena u trbušnoj šupljini, a manjim dijelom (dio tijela i cervix) u zdjeličnoj šupljini. Tijelo maternice u ovaca ima dužinu od 1 do 3 cm, s debljinom stijenke 1 mm u mladih i 1,5 mm u starijih ovaca. Rogovi maternice ovaca su dugi između 10 i 12 cm, a težina maternice je 40 g u mladih i 120 g u starijih negravidnih ovaca. U ovaca je grljak maternice tvrd poput hrskavice, dužine od 4 do 10 cm, vanjskog promjera između 2 i 3 cm. Debljina stijenke je od 0,25 do 0,5 cm u mladih, odnosno oko 1 cm u starijih ovaca. U grljku maternice s gornje i donje strane se nalaze poprečni nabori koji potpuno zatvaraju ulaz u maternicu. Maternični grljak je najuži dio porođajnog kanala (Rupić, 2015).

2.2.4. Rodnica (*vagina*) i stidnica (*vulva*)

Ženski kopulacijski organ sastoji se od rodnice (*vagina*), rodničkog predvorja (*vestibulum vagine*) i stidnice (*vulva*) s dražicom (*clitoris*). Prednji (*kranijalni*) dio rodnice vezan je na grljak maternice, a stražnji (*kaudalni*) dio prelazi u rodničko predvorje koje se sužuje i završava stidnicom. U ovce je rodnica cjevasti, šupli organ dužine od 8 do 14 cm. Leži ventralno ispod rektuma, a dorzalno iznad mokraćnog mjehura, uretre, stidne (*os pubis*) i sjedne (*os ischii*) kosti. Rodničko predvorje je uže od rodnice dugo između 2,5 i 3 cm, koje preko stidnice komunicira s vanjskom sredinom. Od predvorja rodnicu dijeli djevičanska opna (*hymen femininus*) koja u šilježica nije osobito dobro razvijena. Dužina rodnice naspram dužine rodničkog predvorja ima omjer 3:2 (Samardžija i sur., 2010; Rupić, 2015).

Stidnica je vanjski ženski spolni organ, duga od 2,5 do 3 cm. Sastoji se od dvaju debelih stidnih usana (*labia vulvae*) koje se sastaju u dorzalnoj (*commissura labiorum dorsalis*) i ventralnoj stidnoj spojnici (*commissura labiorum ventralis*) i tako zatvaraju stidni procjep (*rima vulvae*). Ventralna je spojnica ušiljena, a dorzalna spojnica zaobljena (Samardžija i sur., 2010).

Dražica je kratak, vrlo osjetilan organ zbog brojnih živčanih završetaka, veličine 2,5 x 1,5 cm i nalazi se u ventralnoj spojnici stidnice. Gornji dio dražice je izbočen iz ventralne

spojnice stidnice. Osnovu dražice čine dva kavernoza tijela (*corpus cavernosa clitoridis*), a slobodni joj je kraj okružen prepucijem (*preputium clitoridis*). Dražica je organ homologan penisu u muških životinja (Samardžija i sur., 2010).

2.3. Spolna zrelost ovaca

Spolna zrelost se pojavljuje u različitoj dobi, ovisno o vrsti životinje, zemljopisno-klimatskom području u kojem životinje obitavaju, tjelesnom razvoju, hranidbi i uvjetima držanja (Samardžija i sur., 2010). Općenito, u životinja držanih u područjima umjerenih zemljopisnih širina koje odlikuje sezonska pripusna aktivnost, hranidba i fotoperiod skladno djeluju na vrijeme aktivacije generatora pulsa gonadotropin otpuštajućeg hormona (GnRH) u mozgu i potiču pubertet (Adam i Robinson, 1994). U ovaca spolno sazrijevanje (pubertet) najviše je pod utjecajem genotipa (pasmine), tjelesne mase, hranidbe, načina držanja, fotoperioda, sezone rođenja, prisutnosti mužjaka, itd. (Mioč i sur., 2007a; Samardžija i sur., 2010).

U životinja koje se razmnožavaju sezonski, vrijeme ulaska u pubertet od posebne je važnosti prvenstveno iz razloga što jedinke koje ne uđu u pubertet tijekom jedne sezone imaju za godinu dana odgođenu reprodukciju što umanjuje njihovu ukupnu životnu proizvodnju. U mnogim sustavima uzgoja ovaca vrlo je važno da je janjad rođena što ranije u sezoni tijekom obilne i visokokvalitetne hrane što će u konačnici omogućiti da se ta grla dovoljno brzo razvijaju i uđu u pubertet prije kraja sljedeće pripusne sezone (Adam i Robinson, 1994).

Pubertet se u šilježica definira vremenom kad se javlja prva ovulacija i prvi estrus koji se javljaju jedino tijekom rasplodne sezone. Pubertet je proces u kojem mlada ovca (šilježica) postaje sposobna spontano ovulirati, pariti se (osjemenjivati) i koncipirati. Zanimljivo je da se prva ovulacija u ovaca obično javlja 2 – 3 tjedna prije prvog estrusa (Samardžija i sur., 2010). Ovce u spolnu zrelost (pubertet), ovisno o pasmini, ulaze u dobi od 6 do 8 mjeseci (ranozrele pasmine: Texel, romanovska, finska ovca) ili 8 - 15 mjeseci (kasnozrele pasmine: cigaja i pramenke; Rupić, 2010). Postizanjem spolne zrelosti spolni organi ovce počinju normalno funkcionirati. Međutim, postizanjem spolne zrelosti u ovaca se ne poklapa s postizanjem fizičke zrelosti životinje, odnosno spremnosti za rasplod. S obzirom da spolna zrelost nastupa ranije, u to vrijeme životinje nisu dovoljno fizički razvijene da bi bez negativnih posljedica mogle podnijeti gravidnost, partus i laktaciju. Stoga, ranozrele pasmine ovaca su spremne za prvi pripust u dobi od 6 do 9 mjeseci, a kasnozrele pasmine u dobi od 14 do 24 mjeseca, odnosno nekoliko mjeseci nakon

postizanja spolne zrelosti. S obzirom na njihovi tjelesnu masu, u šilježica se prvi estrus javlja kada postignu tjelesnu masu od 30 do 50 kg, odnosno od 50 do 70% tjelesne mase odrasle ovce (Mioč i sur., 2007a; Samardžija i sur., 2010).

Iako fotoperiod utječe na vrijeme pojave puberteta u više vrsta domaćih životinja, kao što su ovce (Foster i sur., 1986), koze (Deveson i sur., 1992), goveda (Schillo i sur., 1992) i svinje (Paterson i sur., 1992), upravo su životinje kratkog dana (ovce i koze) najviše ovisne o njegovom utjecaju. Stoga, prirodno vrijeme rođenja ovaca i koza u proljeće popraćeno je produžavanjem dnevnog osvjetljenja. Nakon razdoblja dužeg dnevnog osvjetljenja slijedi prirodna promjena fotoperioda, koja treba biti popraćena normalnim rastom i tada pubertet nastupa tijekom skraćivanja dnevnog osvjetljenja, odnosno u jesen iste godine (Adam i Robinson, 1994).

U ovaca i koza koje odlikuje sezonska reproduksijska aktivnost, ženski potomci postaju spolno zreli tijekom sljedeće pripusne sezone (Hafez, 1952; Papachristoforou i sur., 2000). Čak i u pasmina ovaca koje odlikuje kraća ili slabije izražena reproduksijska aktivnosti, kao što je Chios, reproduksijsko ponašanje se može smatrati sezonskim iz razloga što dostižu pubertet u kolovozu-rujnu (jesen) bez obzira jesu li rođene u jesen, kasnu zimu ili rano proljeće (Bizelis i sur., 1990; Papachristoforou i sur., 2000). Reprodukcijski ciklus šilježica u pubertetu tijekom prve pripusne sezone započinje kasnije i pripusna sezona je kraća u odnosu na odrasle ovce (Hafez, 1952). Reprodukcijski razvoj šilježica pod utjecaj je genotipa (pasmine) i okolišnih čimbenika te njihovog međudnosa (Land, 1978). S obzirom da fotoperiod ima velik utjecaj na reproduksijsku aktivnost ovaca, dokazan je njegov utjecaj na ulazak ovaca u pubertet. S obzirom na doba godine kada je ovca rođena, izložena je različitom utjecaju fotoperioda, stoga i dob ovaca u kojoj ulaze u pubertet ovisi o sezoni rođenja. Tako janjad koja je rođena u proljeće, kao i ona rođena u jesen ulazi u pubertet tijekom prve jeseni koja uslijedi nakon rođenja (Foster, 1981). Janjad rođena u jesen ulazi u pubertet 4 tjedna kasnije u sezoni, ali s većom dobi (za 4 mjeseca) u usporedbi s janjadi rođenom u proljeće (Foster, 1981). Za normalno spolno sazrijevanje ženska janjad, prije utjecaja kratkih dana, mora biti izložena dugim danima tijekom rasta i razvoja (Foster i sur., 1986), a prirodno, duži dani su tijekom kasnog proljeća i ljeta. Čini se da je izloženost životinje dugom fotoperiodu povezana s aktivacijom sustava koji regulira sekreciju gonadotropina (Sanford i sur., 1984; Pelletier i Almeida, 1987). S obzirom na njihovu dob, prerano izlaganje ženske janjadi kratkom fotoperiodu odgađa početak aktivnosti jajnika, te je za početak ovulacije tijekom kratkih dana potrebno janjad izložiti djelovanju dugih dana (većoj razini svjetla; Foster, 1983). U skladu s navedenim, u istraživanju Nowak i Rodway (1985) primjena implantata melatonina u svrhu poticanja ranijeg ulaska u pubertet u dobi od 7,5 tjedana nije imala

utjecaj na početak ovulacije, dok su implantati primijenjeni u dobi od 19,5 tjedana, tj. kada je janjad bila izložena djelovanju dužeg fotoperioda, potaknuli ovulaciju.

Osim navedenih čimbenika koji utječu na vrijeme pojave puberteta u mladim ovaca, važnu ulogu imaju i tjelesne pričuve (Adam i Robinson, 1994). Tako ženska janjad rođena u proljeće koja je odgovarajuće hranjena tijekom prve jeseni ulazi u pubertet u ranijoj dobi i s većom tjelesnom masom u odnosu na janjad koja je u nekoj fazi rasta bila ograničeno hranjena. Stoga odgovarajuća hranidba tijekom gravidnosti i nakon janjenja ključan je čimbenik koji kontrolira vrijeme pojave puberteta (Adam i Robinson, 1994).

2.4. Spolni ciklus ovaca

Spolna se aktivnost ženki domaćih životinja očituje specifičnim promjenama na spolnim organima, ali i u čitavom organizmu uz promjenu ponašanja životinje. Svrha promjena na spolnim organima je priprema tih organa za pripust (osjemenjivanje), oplodnju i razvoj oplođene jajne stanice (zigote, zametka, fetusa), odnosno mladunčadi u maternici i rogovima maternice. Ciklično se ponavljanje navedenih promjena naziva spolni ciklus ili estrusni ciklus koji u različitim vrsta sisavaca ima različiti tijek (Samardžija i sur., 2010; Rupić, 2015).

U ovaca je vrijeme pojave estrusa sezonsko, jer se spolni ciklus odvija samo u određenoj sezoni godine te se plotkinja tjera više puta tijekom sezone, sve dok ne koncipira ili prođe sezona. Stoga su ovce sezonski poliestrične životinje. U njih je moguće razlikovati razdoblje spolne aktivnosti (*estrus*) koje se izmjenjuje s razdobljem spolne neaktivnosti (*anestrus*), tijekom kojeg organi spolnog sustava uglavnom miruju. Tijekom anestrusa rast i razvoj folikula je minimalan, a žuto tijelo (*corpus luteum* – CL) je između dva uzastopna estrusa u regresiji i izvan funkcije (Samardžija i sur., 2010; Rupić, 2010; 2015).

Spolni ciklus je vremensko razdoblje između dva slijedna estrusa. Spolni se ciklus ovaca tijekom sezone parenja ponavlja u prosječnim razmacima od 16 do 17 dana s rasponom od 14 do 18 dana (Hafez, 1952; Asdell, 1964). Fabre-Nys i Martin (1991) navode da estrusni ciklus u ovaca traje 17 dana, a dan estrusa (dan 0) općenito se podudara s početkom preovulatornog vala gonadotropina. Spolni ciklus ovaca je reguliran mehanizmom sprege na osovini hipotalamus-hipofiza-jajnici. U zimskim, hladnim i suhim mjesecima spolni ciklus je dulji, dok je u kišnom i toplom razdoblju kraći. U prijelaznom razdoblju između anestrusa i rasplodne sezone (krajem ljeta) česti su kraći ciklusi u trajanju od samo 12 dana (Samardžija i sur., 2010).

Spolni ciklus ovce prilazi kroz četiri osnovne faze: proestrus, estrus, metestrus i diestrus (Heape, 1990). Proestrus i estrus čine folikularnu fazu spolnog ciklusa u trajanju 3 - 4 dana, dok metestrus i diestrus čine lutealnu fazu spolnog ciklusa koja traje 13 - 14 dana (Mioč i sur., 2007a; Samardžija i sur., 2010). Ovulacija se u ovaca događa približno 24 sata nakon početka skoka gonadotropina, dok luteoliza obično nastupi na 14. ili 15. dana estrusnog ciklusa (Scaramuzzi i sur., 1993). Rast i razvoj folikula, odnosno folikulogeneza (engl. *Folliculogenesis*) u ovaca odvija se od puberteta i nastavlja tijekom odrasle dobi, kroz navedeno razdoblje samo nekolicina folikula od nekoliko milijuna će se razviti do faze sposobne za ovulaciju, a još manje njih biti će ovulirano (Souza i sur., 1997). Smatra se da proces folikulogeneze traje oko 6 mjeseci, a većinu vremena odvija se rast primarnih folikula do promjera od 2,5 mm. Rast folikula od 2,5 do 5 mm odvija se u samo nekoliko dana i to je ključna faza u selekciji folikula do dominantnog ili estrogenog stadija, ovisno o hormonalnom okruženju (Scaramuzzi i sur., 1993).

2.4.1. Proestrus (*proestrus*)

Proestrus je kratko razdoblje pojačane aktivnosti organa spolnog sustava prije estrusa u kojem hipotalamus izlučuje gonadotropne otpuštajuće hormone (GnRH; engl. *Gonadotropin-releasing hormone*) kojima regulira otpuštanje gonadotropnih hormona hipofize: folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i lutenizirajućeg hormona (LH). Povećanjem razine FSH na jajnicima se stimulira rast folikula, koji počinju izlučivati steroidne hormone jajnika, 17β -estradiol i estron. Najčešće proestrus u ovaca traje 1 - 2 dana (Heape, 1990), a obično u šilježica i mlađih ovaca traje kraće (Samardžija i sur., 2010). U ovom razdoblju dolazi do intenzivnog rasta Graafovih folikula, stvaranja estrogena i proliferacije sluznice maternice (Rupić, 2015).

2.4.2. Estrus (*oestrus*)

Estrus ili razdoblje spolnog žara je faza u kojoj se ovca izrazito mrče i spremna je za prirodni pripust ili umjetno osjemenjivanje. Estrus traje od 18 do 72 sata, ili prosječno 36 sati (Asdell, 1964). Trajanje estrusa ovisi o broju ovuliranih jajnih stanica te je dulji ako ovca ovulira veći broj jajnih stanica. Ukoliko je ovca stalno izložena nazočnosti ovna skratit će se trajanje estrusa i ubrzati pojava ovulacije. Nadalje, estrus traje kraće u šilježica i mlađih ovaca nego u starijih ovaca, a prvi estrus u pubertetu kraći je od narednih estrusa (Samardžija i sur., 2010). Trajanje estrusa pod izrazitim je utjecajem pasmine (Gordon, 1997). U estrusu visoka razina estrogena djeluje pozitivnom povratnom spregom na adenohipofizu potičući izlučivanje lutenizirajućeg hormona koji dovodi do konačnog dozrijevanja i ovulacije Graafovih folikula. U ovaca ovulacija je spontana i zbiva

se pred kraj estrusa, najčešće 20 do 40 sati, a u prosjeku 27 sati od početka estrusa (Gordon, 1997), odnosno 24 sata poslije porasta LH vala (Cumming i sur., 1971; Scaramuzzi i sur., 1993).

2.4.3. Metestrus (*metoestrus*)

Metestrus ili post estrus je faza koja slijedi nakon estrusa i traje 2 - 3 dana (Heape, 1990) te u njoj prestaju znakovi mrkanja. U toj fazi spolnog ciklusa dolazi do tvorbe žutog (žutih) tijela, prestaje hiperemija, edemi i proliferacija sluznice spolnih organa, iscjedak iz spolnih organa se znatno smanjuje ili potpuno nestaje, a sluznica maternice ulazi u sekrecijsku, odnosno prijevaidnu fazu. U šupljini ovuliranog folikula ubrzano se oblikuje žuto tijelo, a sluznica se maternice pretvara u trofički organ. Žuta tijela, uglavnom pod utjecajem LH i prolaktina, nastaju pretvorbom granulosa stanica u luteinske stanice. U metestrusu se znatno smanjuje razina estrogenih hormona, a povećava razina progesterona kojeg izlučuje žuto tijelo (Samardžija i sur., 2010). Progesteron priprema sluznicu maternice za prihvata ploda ukoliko je došlo do oplodnje, mehanizmom negativne povratne sprege prema osovini hipotalamus–hipofiza. Kao posljedica niske razine FSH i LH tijekom metestrusa nastavlja se rast folikula na jajnicima, ali izostaje njihovo dozrijevanje i ovulacija.

2.4.4. Diestrus (*dioestrus*)

Diestrus obuhvaća razdoblje aktivnog žutog tijela i traje od 10 do 11 dana. U to vrijeme žuto tijelo sazrijeva, sluznica rodnice postaje bijela, a cerviks zatvoren. Maternične žlijezde podliježu hiperplaziji i hipertrofiji, a maternica se priprema za prihvata i nidaciju zametka. Žuto tijelo je endokrinološki aktivno, u maksimalnoj funkciji i izlučuje velike količine progesterona. Ako nije bilo oplodnje, pri kraju diestrusa počinje regresija žutog tijela pod utjecajem prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) iz endometrija maternice, a dolazi i do regresije endometrija. Tijekom rasplodne sezone u ovce se paralelno s prestankom funkcije žutog tijela počinju razvijati i dalje rasti primordijarni folikuli te nastupa proestrus i počinje novi spolni ciklus (Samardžija i sur., 2010).

Prijelaz od anestrusa do početka rasplodne sezone odvija se postupno s pojavom kratkih ciklusa iz razloga što prvo žuto tijelo (*corpus luteum*, CL) često preuranjeno regresira, već 5 - 6 dana nakon što je formirano (Rosa i Bryant, 2003). Ovulatorna aktivnost i estrusno ponašanje pokazuju sezonske promjene, međutim postoje određena odstupanja na početku i na kraju pripusne sezone kada se javlja ovulacija koja nije popraćena estrusom. Samo nakon kraja prvog ciklusa jajnika pojavljuje se estrus

popraćen promjenama ponašanja. Tihe ovulacije, koje nisu povezane s početkom ili krajem pripusne sezone, također se mogu pojaviti u nekih pasmina sredinom anestrusa (Ortavant i sur., 1988).

2.5. Sezonska poliestričnost ovaca

U područjima umjerenog klimatskog pojasa, uslijed promjene godišnjih doba, životinje se suočavaju sa sezonskim promjenama temperature i dostupnosti hrane. U svrhu lakšeg suočavanja s navedenim okolišnim promjenama, razvile su različite fiziološke prilagodbe kao što su: hibernacija, izmjena krzna, skladištenje energije taloženjem masti te promjene u proizvodnji topline smeđeg masnog tkiva. Uz navedeno, jedna od čestih značajki većine divljih vrsta životinja je razvoj sezonske reprodukcije koja omogućuje da partus nastupi u optimalno doba godine (obično u proljeće) te da novorođenče raste tijekom povoljnih temperatura i dostupnosti hrane prije sljedeće zime (Thiéry i sur., 2002). Proces pripitomljivanja doveo je do gotovo potpunog gubitka navedene prilagodbe u goveda i svinja, ali je ona uglavnom još uvijek zadržana u većine pasmina ovaca, koza i konja koji potječu s umjerenog klimatskog pojasa.

U sezonski poliestričnih vrsta životinja pa tako i u ovaca, sezona parenja, odnosno razdoblje spolne aktivnosti, je regulirano duljinom dana. Skraćivanje duljine dana potiče epifizu na izlučivanje hormona melatonina tijekom noćnih sati. Stoga, duljina dana, odnosno fotoperiod, je glavni okolišni čimbenik koji kontrolira sezonost reprodukcije ovaca (Malpaux i sur., 1997) na način da sezona visoke spolne aktivnost nastupa tijekom kratkih dana, a anestrusna sezona tijekom dugih dana (Misztal i sur., 2002). Organizam prima informaciju o promjeni fotoperioda putem hormona melatonina. Promjene u duljini izlučivanja melatonina stvaraju signal na živčane strukture koje kontroliraju izlučivanje gonadotropina iz hipofize tako da dugo trajanje djeluje stimulativno, a kraće inhibitorno (Misztal i sur., 2002).

Širok raspon okruženja u kojima su se razvile različite pasmine ovaca rezultirao je znatnim odstupanjima u duljini pripusne sezone i to u rasponu od monoestričnosti u nekih primitivnih pasmina do pasmina merino tipa koje su u stanju janjiti se gotovo tijekom cijele godine (Eckstein i Zuckerman, 1956; cit. Haresign i sur., 1985). Poznato je da su, u pasmina ovaca koje potječu iz tropskih područja, estrus i pripusna aktivnost prisutni tijekom cijele godine (Hafez, 1952; Chemineau i sur., 1992; Noel i sur., 1993; Ravindra i Rawlings, 1997; Bartlewski i sur., 1998). Isto tako u pasmina koje potječu iz područja Mediterana te one koje vuku podrijetlo od merina odlikuje dulja pripusna sezona u odnosu

na pasmine ovaca koje potječu s viših zemljopisnih širina (Hafez, 1952). Međutim, osim između pasmina, dužina pripusne sezone i dužina anestrusa vrlo je varijabilna i u pojedinim ovaca iste pasmine (Hafez, 1952; Goodman, 1994). Plodnije pasmine ovaca imaju dužu pripusnu sezonu u odnosu na pasmine manje plodnosti u istim klimatskim uvjetima (Goodman, 1994). Općenito, rasplodna sezona ovce, odnosno ovulacijska i/ili estrusna aktivnost, počinje sredinom ili krajem ljeta, tijekom smanjivanja intervala dnevnog osvjetljenja, a završava tijekom zime, tijekom produžavanja intervala dnevnog osvjetljenja (Hafez, 1952).

2.5.1. Fotoperiod

Proučavajući utjecaj duljine dana i noći na rast i razmnožavanje biljaka Garner i Allard još davne 1920. godine predložili su da pojam fotoperiod označava povoljnu duljinu dana za svaki organizam (Garner i Allard, 1920). Fotoperiod je vremensko razdoblje od 24 sata tijekom kojeg je organizam izložen prirodnom ili umjetnom svjetlu. Fotoperiod uvijek nastupa u isto doba godine te, za razliku od drugih klimatskih čimbenika, kao što su temperatura i količina oborina, ostaje konstantan tijekom godina stoga je najčešće korišten čimbenik sinkronizacije u životinjskom svijetu (Karch i sur., 1984). Upravo konstantnost promjene duljine dana tijekom godina čine fotoperiod najpouzdanijim znakom promjene sezone iz razloga što se solsticij i ekvinocij javljaju u gotovo identično vrijeme svake godine. Iz navedenih razloga moguće je da životinje koriste promjene fotoperioda kao kalendar (Ikegami i Yoshimura, 2012), a navedeni fenomen se naziva fotoperiodizam, odnosno označava odgovor organizma na relativnu dužinu dana i noći (Garner i Allard, 1920). Sezonost reproduksijske aktivnosti u većine pasmina ovaca, koje potječu s umjerenog klimatskog pojasa, pod kontrolom je fotoperioda (Malpaux i sur., 1989) i on se smatra glavnim okolišnim čimbenikom koji određuje početak i trajanje pripusne sezone ovaca (Malpaux i sur., 1996). Nasuprot navedenom u tropskim i subtropskim područjima ovce su ili asezonalne ili naizmjenično poliestrične ovisno o kvaliteti i dostupnosti hrane koja diktira pripusnu aktivnost (Rosa i Bryant, 2003).

Informaciju o promjeni fotoperioda životinja prima putem hormona melatonina kojeg sintetizira žlijezda epifiza. Noćni signal melatonina pruža važne informacije koje, ne samo da podešavaju cirkadijani ciklus na period od 24 sata (Cassone, 1990), već reguliraju reproduksijske i metaboličke pokazatelje u sezonski osjetljivih životinja kao što su ovce i hrčci (Hoffman, 1973; Carter i Goldman, 1983; Wayne i sur., 1988). Životinjske vrste koje koriste fotoperiod za sinkronizaciju pripusne aktivnosti obično su klasificirane u dvije različite kategorije: životinje dugog dana (engl. *long-day breeders*) i životinje kratkog dana (engl. *short-day breeders*). S obzirom da je cilj svake životinjske vrste da partus

nastupi u proljeće, početak pripusne sezone ovisi o duljini gravidnosti. Stoga su ovce, u kojih gravidnost traje 5 mjeseci, životinje kratkog dana te u njih koncepcija nastupa u jesen i početak zime (Ortavant i sur., 1985). U životinja kratkog dana, kao i u životinja dugog dana, potomstvo je rođeno i podignuto tijekom proljeća i ljeta kada je klima umjerena, a hrane ima u izobilju.

Svjetlost najprije percipira mrežnica oka koja prima te preko vidnog živca prenosi svjetlosni podražaj do *nucleus supraopticus* smještenog u prednjem dijelu hipotalamusa. Od *nucleus supraopticus* podražaj se prenosi do *nucleus paraventricularis* potom do gornjih cervikalnih ganglija i dalje preko autonomnog živčanog sustava do epifize koja potiče ili inhibira lučenje melatonina (Swenson i Reece, 1993). Količina izlučenog melatonina ovisi o izmjenama dana i noći jer je trajanje sekrecije melatonina u pozitivnoj korelaciji s duljinom mraka (Karsch i sur., 1984.). Melatonin je kemijski odgovorna tvar putem koje se regulira sinteza i izlučivanje folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH) iz prednjeg režnja hipofize (Samardžija i sur., 2010).

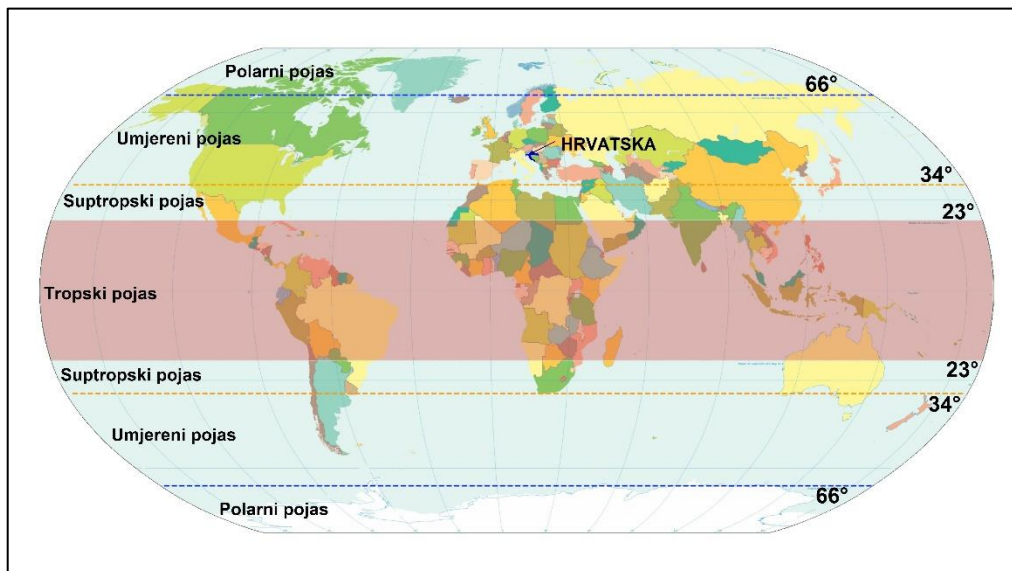
Iako je sezonska reprodukcija, uglavnom, regulirana fotoperiodom mnogi drugi čimbenici, kao što su pasmina, hranidba, laktacija, socijalna interakcija i sezona rođenja, u interakciji s fotoperiodom na način da moduliraju njegov utjecaj te utječu na vrijeme i dužinu pripusne sezone (Pope i sur., 1989; Ungerfeld i sur., 2004; Forcada i Abacia, 2006).

2.5.2. Područje nastanka pasmine

Ovisnost o fotoperiodu pojedinih pasmina ovaca uvelike ovisi o području s kojeg pasmina potječe gledajući udaljenost od ekvatora prema sjeveru i jugu. Općenito, što je veća geografska širina s koje pasmina potječe to je veća foto ovisnost i kraće razdoblje pripusne aktivnosti (Poulton, 1987). Tako pasmine koje potječu s područja između 35° sjeverne i 35° južne geografske širine imaju tendenciju parenja tijekom cijele godine (Robinson, 1981), dok je na geografskim širinama većim od 35° uobičajeno pronaći ovce koje su sezonski poliestrične i čija je pripusna sezona inicirana sa smanjenjem dnevnog osvjetljenja (Rosa i Bryant, 2003).

Poznato je da pasmine ovaca uzgajane u tropskim područjima (od 23° sjeverne zemljopisne širine do 23° južne zemljopisne širine), kao i one uzgajane u suptropskim područjima (od 24° do 34° sjeverne zemljopisne širine i od 24° do 34° južne zemljopisne širine; slika 1.) odlikuje duža pripusna sezona, budući da se u navedenim područjima ne opaža značajnija promjena fotoperioda. Ustvari navedene pasmine mogu ovulirati tijekom cijele godine te ne pokazuju anovulacijski period, odnosno anestrusno razdoblje (Gonzalez i sur., 1992; Arroyo i sur., 2007). Pasmine ovaca, kao što su australski merino i

mediteranske pasmine, koje potječu sa srednjih geografskih širina (od 35° do 40° sjeverne zemljopisne širine) odlikuje pojava kraćeg anestrusnog razdoblja tijekom kojeg određen broj ovaca može spontano ovulirati (Gómez-Brunet i sur., 2012).



Slika 1. Oznake klimatskih zona s obzirom na dužinu pripusne sezone ovaca

Područje Mediterana karakterizira sezonska dostupnost hrane (utjecaj kišnog razdoblja tijekom zime i proljeća te sušnog razdoblja tijekom ljeta) i gubitak na tjelesnoj masi ovaca u jesen tj. u sezoni pripusta. Stoga su se mediteranske pasmine prilagodile na način da su reducirale sezonsku reprodukciju i njihov odgovor na podražaj fotoperioda mogu modulirati drugi okolišni čimbenici kao što su hranidba ili utjecaj mužjaka (Lindsay, 1996).

Pomicanjem sjevernije ili južnije od ekvatora ovisnost o fotoperiodu postaje sve izraženija. Tako u pasmina ovaca koje potječu sa zemljopisnih širina $> 40^\circ$ sjeverne zemljopisne širine pripusna sezona započinje početkom jeseni kada se dani skraćuju, a završava sredinom zime kada dani ponovno postaju duži. Sa produžavanjem dnevnog osvjetljenja ovulacija prestaje, a životinje ne ovuliraju tijekom dugih dana tijekom proljeća i ljeta (Ortavant i sur., 1985). Međutim, u Francuskoj na 45° sjeverne zemljopisne širine, u pasmine Ile de France pripusna sezona započinje u kolovozu i traje sve do veljače kada započinje anestrusno razdoblje, tijekom kojeg je u ponekih ovaca utvrđena ovulacija (Thimonier i Mauleon, 1969). Još sjevernije, u Velikoj Britaniji (na 56° sjeverne zemljopisne širine), ovce britanskih pasmina, kao što su Finnish Landrace i Scottish Blackface, pokazuju izraženiju sezonost, s još dužim anestrusom koji traje od ožujka/travnja do listopada i za to vrijeme u ovaca nije utvrđena spontana ovulacija (Wheeler i Lands, 1977).

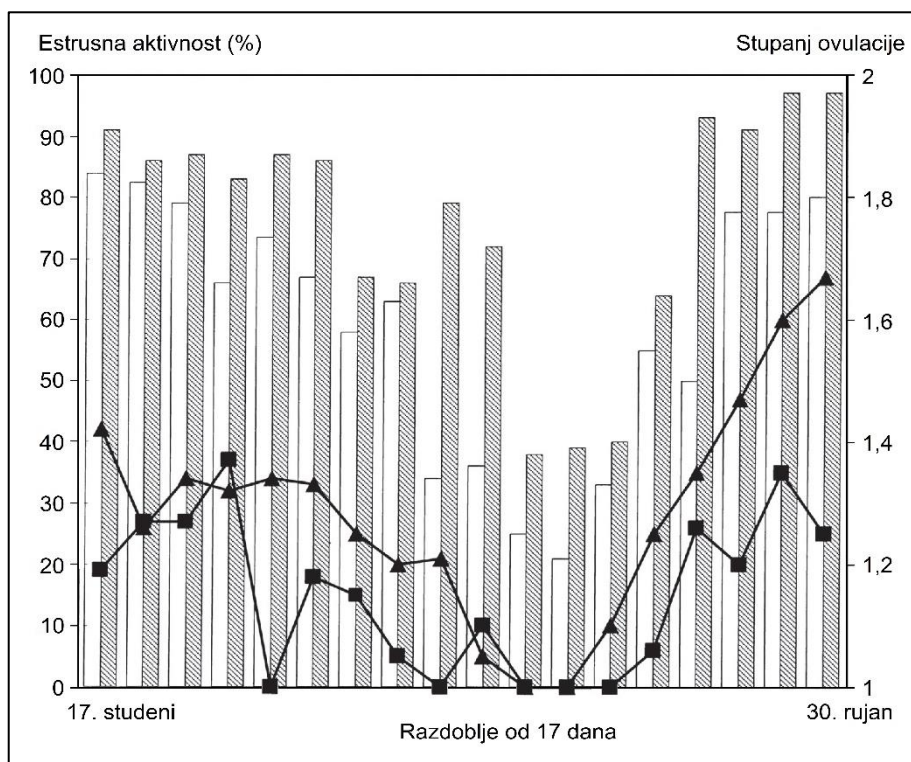
2.5.3. Cirkanualni ritam

Iako je smatrano da razdoblje spolne aktivnosti ovaca isključivo ovisi o dužini dnevnog osvjetljenja, dokazano je da kontinuirano držanje ovaca na kraćem osvjetljenju u razdoblju od zimskog prema ljetnom solsticiju ne sprečava kraj pripusne sezone (Robinson i Karsch, 1984; Malpaux i sur., 1987), kao niti držanje ovaca na dužem osvjetljenju u razdoblju od ljetnog prema zimskom solsticiju ne sprečava početak pripusne sezone (Robinson i sur., 1985). U sezonski poliestričnih pasmina ovaca, postojanje endogenog reprodukcijuskog ritma je dokazano studijom u kojoj su ovce izložene konstantno kratkom (8 sati svjetla/dan) ili dugom danu (16 sati svjetla/dan) ili ravnodnevnichom (12 sati svjetla/dan) fotoperiodu kroz duže vremensko razdoblje te su životinje naizmjenično pokazale razdoblje spolne aktivnosti i razdoblje mirovanja (Karsch i sur., 1989). Uistinu, godišnji reprodukcijuski ciklus je produkt endogenog cirkanualnog ritma koji nije izravno pod utjecajem fotoperioda. Međutim, godišnji reprodukcijuski ciklus je sinkroniziran cirkadijanim ritmom sinteze melatonina (Woodfill i sur., 1994). Trajanje povišene razine melatonina tijekom dugih dana tijekom proljeća i ljeta osigurava signal o duljini dana za sinkronizaciju ritma reprodukcijuske neuroendokrine aktivnosti, omogućavajući da reprodukcijuska aktivnost započne u jesen (Malpaux i sur., 1989; Barrell i sur., 2000). Sve kraći dani između ljetnog solsticija i jesenske ravnodnevnice su odlučujući signal uključen u određivanje kraja reprodukcijuske aktivnosti sredinom zime (Malpaux i sur., 1988) koji pridonose osiguravanju primjerenog trajanja pripusne sezone (Malpaux i Karsch, 1990).

2.5.4. Hranidba

Korisni učinci hranidbe na reprodukcijuske odlike ovaca dobro su poznati. Hranidbu se smatra jednim od najvažnijih čimbenika koji utječe na broj ovuliranih jajnih stanica, čak i u kratkom vremenskom razdoblju od svega 4 - 6 dana. Utjecaj hranidbe na stopu ovulacije očiti je tijekom određenog razdoblja i kada je pojačana hranidba primijenjena tijekom tranzicijskog razdoblja između anestrusa (sezonskog ili laktacijskog) i u vrijeme pripusne sezone (Forcada i sur., 1992). Međutim, hranidba ima slabiji utjecaj na spolnu aktivnost nego na stupanj ovulacije, odnosno broj ovuliranih jajnih stanica. Očigledno, samo ozbiljna pothranjenost može značajno produžiti razdoblje sezonskog anestrusa koji se uglavnom pripisuje ranijem završetku pripusne sezone (Knight i sur., 1983). Suprotno, modifikacija reprodukcijuske sezonalnosti u ovaca koje odlikuju umjerena razina masnih pričuva primjenom različitih razina hranidbe kao jedinog alata menadžmenta čini se teška. Prema istraživanju Forcada i sur. (1992) u području Mediterana moguće je prevladati regulirajući utjecaj fotoperioda na reprodukcijusku sezonost u ovaca koje imaju umjereno

povišenu razinu masnih pričuva. Tako je u ovaca pasmine Rasa Aragonesa utvrđena stalna redukcija (64 dana naprama 113 dana) dužine sezonskog anestrusa u ovaca koje su u razdoblju od studenog do listopada držane na konstantnoj, umjereno visokoj tjelesnoj kondiciji (2,8) u usporedbi s ovcama slabije tjelesne kondicije (2,3; slika 2.), a razlike između dvije skupine u tjelesnoj masi iznosile su 6 kg (42 kg i 48 kg; Forcada i sur., 1992). Najveće razlike u spolnoj aktivnosti između ovaca niže i umjereno visoke tjelesne kondicije, dogodile su se u tranzicijskom razdoblju između sezonskog anestrusa i pripusne sezone, na način da je umjereno visoka tjelesna kondicija povoljno utjecala na raniju pojavu estrusa u ovaca.



Slika 2. Estrasna aktivnost i stupanj ovulacije u ovaca držanih na dvije konstantne razine tjelesne kondicije tijekom godine (ovce kondicije 2,8 – ispunjeni stupići i ▲; ovce kondicije 2,3 – prazni stupići i ■; Forcada i sur., 1992)

Utjecaj visoke razine masnih pričuva na spolnu aktivnost konstantan je između mediteranskih pasmina ovaca i djeluje više kroz odgađanje početka sezonskog anestrusa nego što potiče početak nove reproduksijske sezone, koji je manje pod utjecajem hranidbe (Forcada i sur., 1992), a vjerojatno je snažnije reguliran fotoperiodom. Inhibitorni i stimulirajući utjecaj povećanja dužine dana i duži dani između proljetnog ekvinocija i ljetnog solsticija na spolnu aktivnost (Malpoux i sur., 1989) teško je prevladati samo pomoću hranidbe pa čak i u mediteranskih pasmina ovaca (Forcada i Abacia, 2006).

Hranidbena stimulacija ovaca tijekom sezonskog anestrusa ne može uvijek prevladati inhibitorno djelovanje fotoperioda, premda odgovarajuća hranidba može rezultirati s većom proporcijom ciklirajućih ovaca u navedenom razdoblju. Najveća osjetljivost ovaca na stimulativno djelovanje hranidbe u smislu reduciranja reproduktivske sezonalnosti događa se tijekom tranzicijskog razdoblja između anestrusa i pripusne sezone, osobito na kraju potonjeg kada utjecaj fotoperioda slabi. Na kraju sezonskog anestrusa, fotoperiod ima važnu ulogu u reguliranju početka pripusne sezone, premda je to najbolje vrijeme za uporabu hranidbenih manipulacija s ciljem poboljšanja stupnja ovulacije (Forcada i Abacia, 2006).

2.6. Mehanizam hormonalne regulacije spolnog ciklusa ovaca

Regulacija spolnog ciklusa ovaca odvija se preko međuodnosa tzv. osovine hipotalamus-hipofiza-jajnici i njene neuro-hormonalne strukture. Procesima rasplodivanja povezane su gotovo sve endokrine žlijezde u manjoj ili većoj mjeri, a funkcija endokrinih žlijezda i spolnih organa ovisi o centralnom i vegetativnom živčanom sustavu. To se ponajviše odnosi na ekstrahipotalamička središta, ponajprije kore velikog mozga, talamusa i primozga na koje djeluju njušni, svjetlosni, zvučni i dodirni podražaj iz okoline (Samardžija i sur., 2010).

Podražaji iz okoline koji su došli preko limbičkog sustava središnjeg živčanog sustava analiziraju se u prednjem (rostralnom) spolnom centru hipotalamusa. Prema jačini i tipu podražaja u smislu biološkog sata prelaze u kaudalni genitalni centar koji u specifičnim nukleusima uzrokuje sintezu gonadotropnih otpuštajućeg hormona (GnRH) koji upravljaju endokrinom aktivnošću hipofize (Samardžija i sur., 2010). Sekrecija GnRH u ovaca je ujedno regulirana dužinom sekrecije hormona melatonin iz epifize.

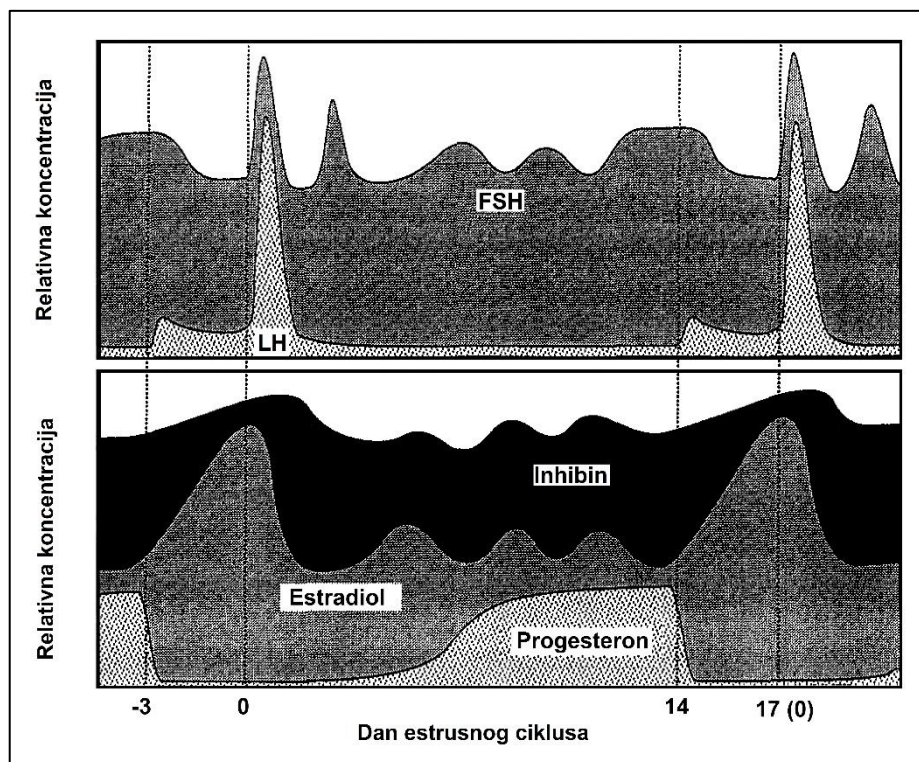
U hipotalamusu postoje dva centra koji reguliraju izlučivanje gonadotropnih hormona: epizotično-tonični i pulzatorni. Epizotično-tonični centar je odgovoran za sekreciju bazalnih koncentracija gonadotropnih hormona i uspostavljanje te održavanje germinativne i endokrine funkcije jajnika. Pulzatorni centar je odgovoran za naglo povećanje koncentracije LH i poticanje ovulacije koja je u ovaca spontana (Samardžija i sur., 2010).

2.6.1. Međudjelovanje hormona tijekom estrusnog razdoblja

U proestrusu na jajnicima počinju dozrijevati folikuli pod utjecajem folikulostimulirajućeg hormona (FSH) prednjeg režnja hipofize. Graafovi folikuli na

jajnicima dozrijevaju za 2 do 6 dana (Rupić, 2015). U ovaca se rast folikula zbiva u vrijeme lutealne faze (aktivnost žutog tijela) unatoč inhibitornom djelovanju progesterona. Regresijom žutog tijela pod utjecajem gonadotropina (FSH i LH) Graafovi folikuli naglo rastu. U vrijeme rasta folikuli luče veće količine estrogena koji su važni za estrusno ponašanje životinje i za naglo otpuštanje prostaglandina važnih za proces ovulacije (Rupić, 2015). Estrogeni potiču hipotalamus na stvaranje GnRH, a on potiče hipofizu na lučenje LH i FSH (Moenter i sur., 1990).

Između uzastopnih preovulacijskih valova gonadotropina, sekrecija lutenizirajućeg hormona (LH) je epizodične prirode (Haresign i sur., 1985). Tijekom lutealne faze spolnog ciklusa u ovaca visok titar progesterona, u sinergiji s niskim razinama estradiola, vrši povratnu vezu na os hipotalamus-hipofiza te ograničava učestalost epizoda LH na jedan puls kroz 3 - 12 sati (slika 3.). Međutim, regresija žutog tijela koja uslijedi, a samim time i micanje progesterona iz cirkulacije, učestalost epizoda sekrecije LH postupno se povećava sve dok ne dostigne stopu od jedne epizode kroz 1 do 2 sata odmah prije preovulacijskog vala gonadotropina (Hauger i sur., 1977; Baird, 1978). Koncentracija progesterona u krvi ovaca je od 3,8 ng/ml tijekom lutealne faze spolnog ciklusa do 0,6 ng/ml u vrijeme estrusa (Baird, 1978). Smanjenjem koncentracije progesterona dolazi do značajnog povećanja koncentracija LH i estradiola (Baird, 1978).



Slika 3. Cirkulirajuća razina glavnih hormona jajnika i hipofize tijekom spolnog (estrusnog) ciklusa ovaca (Scaramuzzi i sur., 1993)

Inverzan odnos između tonične sekrecije FSH i koncentracije progesterona kroz spolni ciklus ovaca manje je očit. Koncentracija FSH pokazuje nejednaka razdoblja relativno visokih vrijednosti izmiješane s razdobljima niskih vrijednosti tijekom lutealne faze, a zatim konstantno pada tijekom folikularne faze (Cahill i sur., 1981; Lahlou-Kassi i sur., 1984). Navedeni diferencijalni uzorak u promjenama toničnih LH i FSH koncentracijama postoji iz razloga što tonične koncentracije LH su pod utjecajem negativne povratne veze steroida jajnika, dok kontrola sekrecije FSH zahtjeva dodatnu ne-steroidnu komponentu jajnika, za koju se smatra da je inhibin (Goodman i sur., 1981).

2.6.2. Međudjelovanje hormona tijekom anestrusnog razdoblja

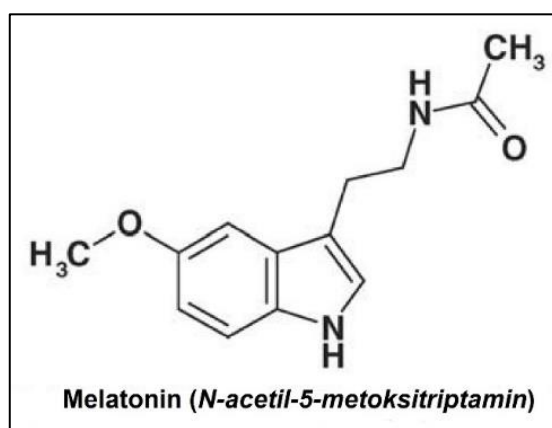
U većine ovaca tijekom anestrusa nije utvrđena ovulacija, međutim usprkos smanjenoj sekreciji gonadotropina tijekom anestrusa, veličina i broj velikih sekundarnih folikula ostaje slična onima utvrđenim tijekom pripusne sezone (Hutchinson i Robertson, 1966). Dok je anestrus u ovaca obilježen smanjenom sekrecijom gonadotropina, tijekom tranzicijskog razdoblja prema pripusnoj sezoni, koncentracije LH i FSH u serumu značajno se povećavaju (Karsch i sur., 1984).

Tijekom anestrusa zamjetan je izostanak preovulacijskog skoka FSH i LH, a samim time i ovulacije, što rezultira bazalnim koncentracijama progesterona (Roche i sur., 1970; Yuthasastrakosol i sur., 1975). Kada se uspoređi razina sekrecije LH tijekom anestrusa i tijekom pripusne sezone uočava se da je frekvencija epizoda LH tijekom anestrusa niža nego u vrijeme lutealne faze spolnog ciklusa (Scaramuzzi i Baird, 1979). Tijekom anestrusa nedostatna je tonična sekrecija LH koja bi trebala potaknuti završnu fazu u rastu i razvoju folikula, što rezultira da potrebna koncentracija estradiola koja služi kao okidač pozitivne povratne veze nikad nije dostignuta (Harasign i sur., 1985).

S endokrinog stajališta, poznato je da se tijekom anestrusne sezone odvija rast i regresija folikula te mogu biti nazočni folikuli veličine kao i tijekom lutealne faze spolnog ciklusa (Webb i Gauld, 1985). Tijekom anestrusa, folikuli proizvode steroide te se nastavljaju mnogi pozitivni i negativni učinci steroida na izlučivanje lutinizirajućeg hormon (LH) kao i tijekom pripusne sezone (Gordon, 1997). Otpuštanje LH se nastavlja epizodno, ali s manjom frekvencijom nego tijekom pripusne sezone (jedan puls svakih 8 – 12 sati, u odnosu na jedan puls svakih 3 – 4 sata sredinom lutealne faze, jedan sat svakih 1 – 2 sata neposredno prije preovulatornog skoka LH te jedan puls svakih 20 minuta tijekom predovulatornog skoka LH; Karsch i sur., 1984). Temeljna razlika se događa u koncentraciji progesterona u plazmi koja tijekom anestrusa praktično ostaje na nemjerljivoj razini (Karsch i sur., 1984). Razina folikulostimulirajućeg hormona (FSH) ne razlikuje se značajno od razine utvrđene tijekom pripusne sezone (Walton i sur., 1977).

2.7. Melatonin

Pinealna žlijezda (lat. *glandula pinealis*) ili epifiza poznata je više od 2 000 godina. Tijekom povijesti znanstvenici su joj pripisivali veliki broj funkcija (suzbijanje infekcija, poboljšanje raspoloženja, povećanje dugovječnosti, ...) no također su postojali i oni koji su je smatrali rudimentiranim organom bez funkcije (Karasek i Winczyk, 2006) sve do 1958. godine kada je otkriven hormon melatonin kao supstanca izolirana iz ekstrakta goveđe epifize. Godinu dana kasnije razjašnjena je struktura melatonina kao *N-acetil-5-metoksitriptamin* (Lerner i sur., 1959; slika 4.). Ime mu potječe od njegove prvotno otkrivene funkcije, tj. utjecaja na svjetlucanje kože riba i vodozemaca (Lerner i sur., 1958).



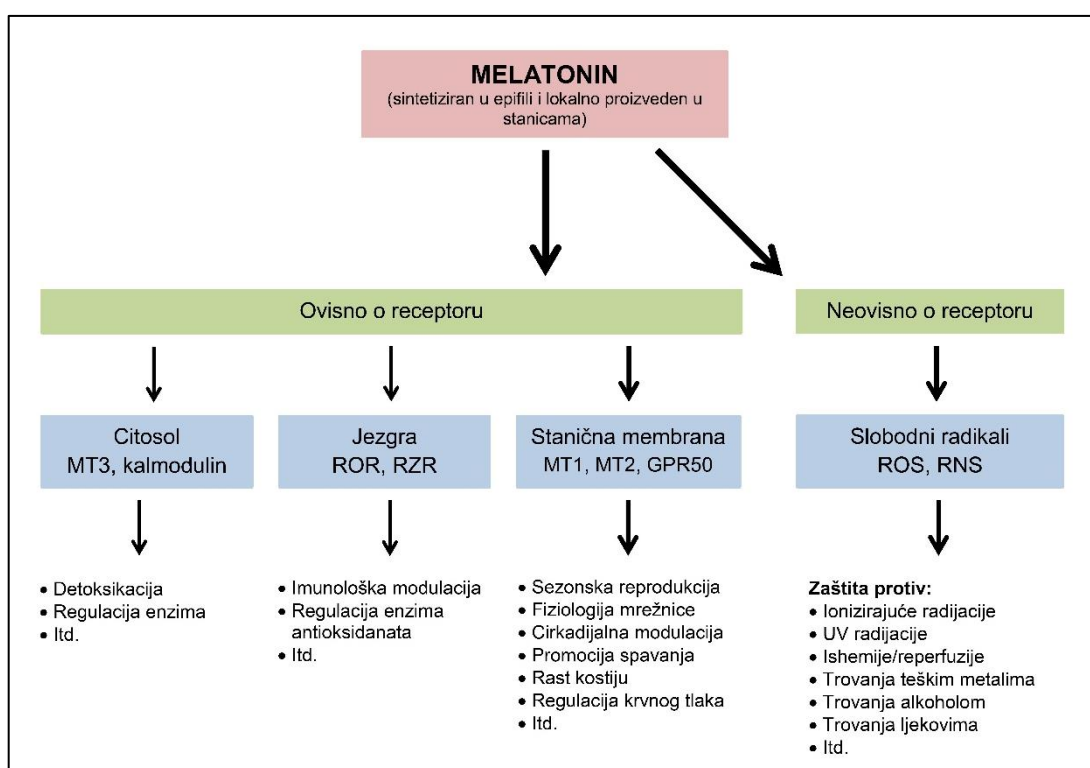
Slika 4. Struktura molekule melatonina (Hardeland i sur., 2006)

Melatonin je indolamin s kemijskom formulom $C_{13}H_{16}N_2O_2$, molekulske mase 232,28 g/mol (Jain i Bhatnagar, 2007), a strukturno se sastoji od indolnog prstena te amino skupine, etera i amida (Karlson, 1993). Dvije funkcionalne skupine melatonina, ne samo da su odlučujuće za specifičnost vezanja molekule melatonina na receptore, već djeluju amfifilno omogućujući ulazak molekule u svaku stanicu, odjeljak ili tjelesnu tekućinu (Poeggeler i sur., 2002). Biodostupnost melatonina je od 30 do 50%, a procijenjeni poluživot od 32 do 40 minuta (Jain i Bhatnagar, 2007).

Melatonin je jedinstvena univerzalna supstanca, široko rasprostranjena u prirodi, s molekularnom strukturom nepromijenjenoj u životinjskom i biljnom carstvu. U živom organizmu posvuda je raspoređen te se navodi da je jedan od najprimitivnijih bioloških signala prisutnih na Zemlji (Claustrat i sur., 2005). Pronađen je u bakterijama, jednostaničnim eukariotima, algama, gljivama, biljkama, životinjama i u ljudi (Tan i sur., 2010). Također je prisutan u različitim tkivima i organima, kao što su Harderova žlijezada,

ekstraorbitalna suzna žlijezda, mrežnica oka (lat. *retina*), stanice koštane srži, trombociti, limfociti, koža, eksterokromafinske stanice probavnog sustava te žuč različitih životinjskih vrsta (Zawilska i Nowak, 1991; Konturek i sur., 1997; Djeridane i Touitou, 2001; Bubenik, 2002; Carrillo-Vico i sur., 2004; Pandi-Perumal i sur., 2006).

Istraživanja u različitim sisavaca, pokazuju važnost melatonina u regulaciji širokog spektra fizioloških funkcija. Osim što regulira cirkadijani ritam usporava starenje, djeluje na kardiovaskularni sustav, mentalno stanje i ponašanje, ima imunostimulativno djelovanje te regulira rad endokrinih žlijezda, a posljedično time i reprodukciju sezonski poliestričnih životinja (Ortavant i sur., 1985; Reppert i sur., 1994; Barrett i sur., 1997; Chowdhury i sur., 2008; slika 5.).



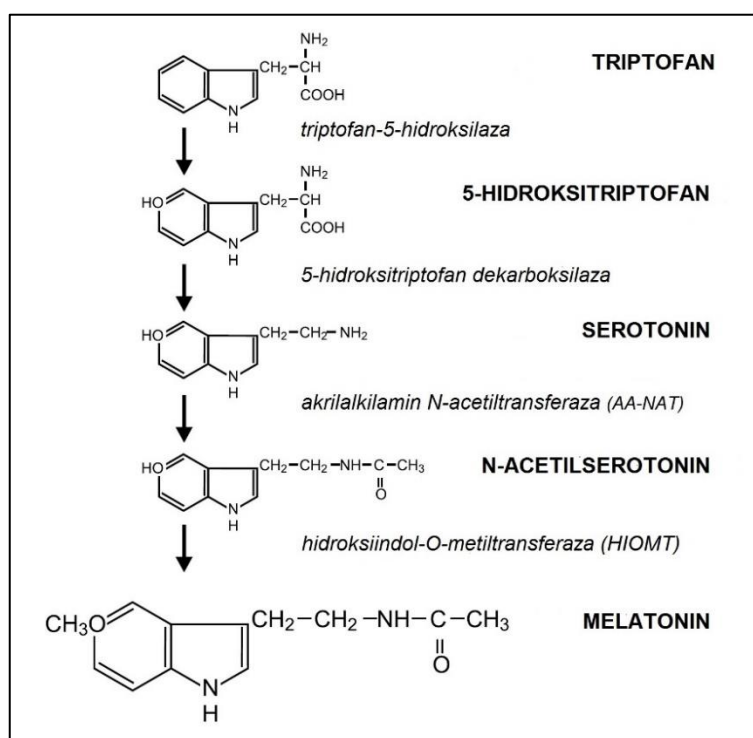
Slika 5. Djelovanje melatonina u sisavaca (Reiter i sur., 2014)

Značajniju pozornost hormon dobiva kada je otkriveno da melatonin regulira reset cirkadijanog ritma (Armstrong i sur., 1986), te da je u vrsta koje reagiraju na promjene fotoperioda, uključen u mjerenje duljine dana, okolišne varijable korištene za određivanje vremena reprodukcije sezone, metabolizma i ponašanja (Reiter, 1991). Cirkadijani ritam sinteze melatonina iz epifize i njegovo otpuštanje potaknuti su cirkadijanim pejsmejerom (engl. „*master clock*“) smještenog u suprahijazmatičnoj jezgri hipotalamusa koji komunicira sa epifizom preko multisinaptičkih puteva (Dubocovich i sur., 2010). Cirkadijani ritam melatonina razvijen je u janjadi već u prvih nekoliko tjedana života i precizno

odražava okolišni fotoperiod (Claypool i sur., 1989). Štoviše, temeljem promjene u sekreciji koncentracije prolaktina, čini se da je janjad u mogućnosti raspoznati promjene u dužini dana već od sedmog dana nakon janjenja (Ebling i sur., 1988).

2.7.1. Biosinteza melatonina

Melatonin se primarno sintetizira i izlučuje iz stanica epifize, pinealocita, tijekom noći bez obzira na dnevnu ili noćnu aktivnost životinje. Osim u epifizi melatonin se sintetizira i u stanicama koštane srži, trombocitima, limfocitima, koži, gastrointestinalnom traktu te žuči (Chowdhury i sur., 2008). Ritam sinteze melatonina strogo je kontroliran uvjetima osvjetljenja. Biosinteza melatonina odvija se u četiri stupnja koji uključuju reakcije hidroksilacije, dekarboksilacije, acetilacije i metilacije (slika 6.).



Slika 6. Sinteza melatonina (Karasek i Winczyk, 2006)

U prvom koraku sinteze melatonina, prekursor melatonina, aminokiselina L-triptofan preuzeta je iz krvi u žlijezdu epifizu. U pinealocitima enzim triptofan-5-hidroksilaza hidroksilizira L-triptofan u 5-hidroksitriptofan. U drugom koraku, 5-hidroksitriptofan se, uz dekarboksilazu aromatskih aminokiselina, dekarboksilira do serotonin, odnosno 5-hidroksitriptamina (5-HT). Serotonin je zatim acetiliran (N-acetilacija) do N-acetilserotonina pomoću enzima arilalkilamin N-acetiltransferaze (AA-NAT) koja je ujedno i ključni enzim u sintezi melatonina. U završnom koraku,

N-acetilserotonin je O-metiliran pomoću hidroksiindol-O-metiltransferaze (HIOMT) u melatonin (Pandi-Perumal i sur., 2006; Chowdhury i sur., 2008; Radogna i sur., 2010).

U sisavaca je biosinteza melatonina u epifizi kontrolirana signalima iz retine koji se prenose simpatikusom, tzv. noradrenergičnim retinohipotalamičkim putem, koji se proteže od retine do suprahiazmatične jezgre (SCN) hipotalamusa. Taj dio hipotalamusa naziva se biološki sat koji generira 24-satni cirkadijani ritam (Hardeland i sur., 2005). Svjetlost koja pada na retinu šalje signale do epifize i stimulira periodičnu sintezu melatonina. Temeljni pigment u fotoreceptorima u retini je melanopsin. Postganglijska simpatička živčana vlakna, sa završetcima u epifizi, oslobađaju noradrenalin, koji također ima ulogu u sintezi melatonina. Povećanje noradrenergične stimulacije noću preko β i α_1 -adrenoreceptora na pinealocitima povećava intracelularnu koncentraciju cAMP-a, što dovodi do aktivacije AA-NAT (N-acetiltransferaze) i povećane sinteze melatonina. Zbog toga je sinteza melatonina stimulirana noću, a inhibirana danju (Chowdhury i sur., 2008).

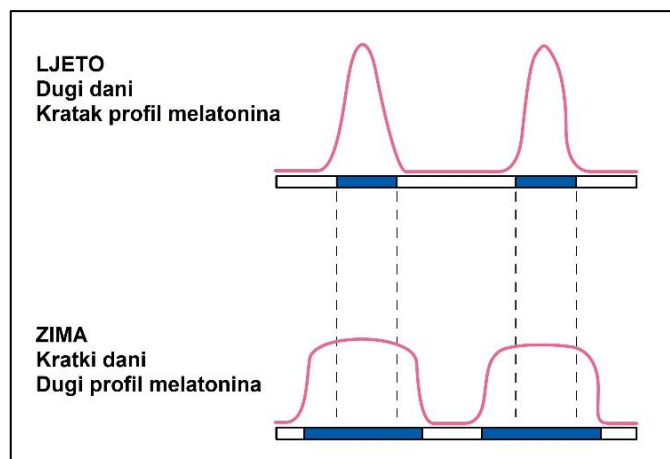
Biosinteza melatonina u stanicama izvan hipofize nije regulirana izmjenom dana i noći (Bubenik, 2002).

2.7.2. Pohrana melatonina

Nakon što je sintetiziran, melatonin se ne pohranjuje u pinealocitima, već difuzijom prelazi u kapilarni sustav i cerebrospinalnu tekućinu te brzo dospijeva do svih tkiva i tjelesnih tekućina. Osim u krvi i cerebrospinalnoj tekućini, melatonin je prisutan u slini, urinu, žuči, Graffovom folikulu, spermi, amnionskoj tekućini i majčinom mlijeku (Karasek i Winczyk, 2006; Pandi-Perumal i sur., 2006). Izračunato je da srednje dnevne razine proizvodnje endogenog melatonina su oko 30 μg (Lane i Moss, 1985). Koncentracija melatonina u cerebrospinalnoj tekućini je 20–30 puta viša nego u krvi, a s udaljenošću od epifize se naglo snižava što ukazuje na to da mozak koristi melatonin. Melatonin u krvnoj plazmi sisavaca najvećim je dijelom podrijetlom iz epifize. Oko 50 do 75% melatonina u krvi veže se na albumin i glikoproteine. Vrijeme poluživota endogenog melatonina u serumu je 30–60 min, a egzogenog 12–48 min (Chowdhury i sur., 2008).

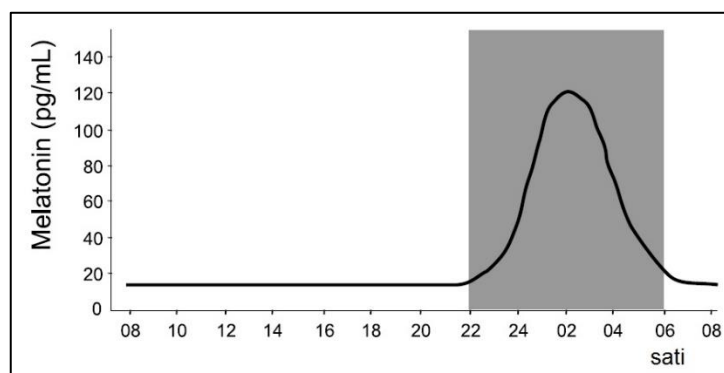
2.7.3. Sekrecija melatonina

Sekrecija ili lučenje melatonina povezana je s trajanjem noći, a produženo trajanje mraka rezultira dužom sekrecijom melatonina do jedne određene količine koja je definirana specifično za pojedinu životinjsku vrstu. U ovaca produžavanjem trajanja mraka iznad 16 sati ne dolazi do produžene sekrecije melatonina (slika 7.; Arendt, 1998).



Slika 7. Dužina sekrecije melatonina ovisno o promjeni fotoperioda u ovaca (Arendt, 1998)

Tijekom prve polovice noći, koncentracija melatonina postupno se povećava, maksimalnu koncentraciju postiže između 2 i 4 sata u noći (slika 8.), a tijekom druge polovice noći koncentracija melatonina postupno pada (Chowdhury i sur., 2008). Takav cirkadijani ritam prisutan je u svih kralježnjaka, neovisno jesu li aktivni danju ili noću, a količina i trajanje biosinteze i izlučivanje melatonina iz epifize ovisi o duljini trajanja noći i predstavlja „sat“ ili „kalendar“ kojim se usklađuju ostale biološke funkcije.



Slika 8. Cirkadijani profil koncentracije melatonina u serumu ljudi (Karasek i Winczyk, 2006)

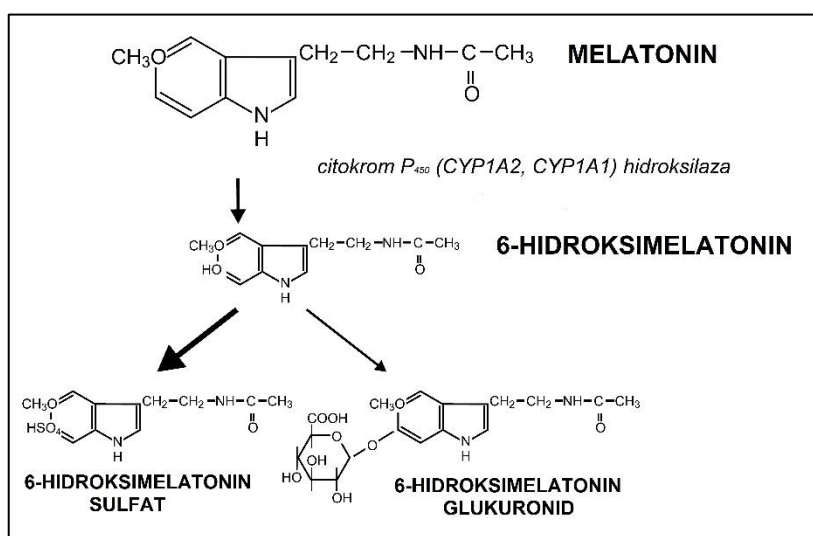
Sinteza i izlučivanje melatonina u opću cirkulaciju pod utjecajem su „ritma“ dana i noći, a karakterizirani su niskim ili nemjerljivim koncentracijama (<10 pg/mL) tijekom dana te povećanjem razine sekrecije na 200-400 pg/mL tijekom noći (Bittman i sur., 1983). Srednje koncentracije melatonina u krvi ovaca na kraju dana iznose $5,4 \pm 0,6$ pg/mL, dok su koncentracije izmjerene na kraju noći $179,4 \pm 23,7$ pg/mL (Migaud i sur., 2005). Razina melatonina u krvi sisavaca gotovo isključivo dolazi iz epifize, dok melatonin sintetiziran u drugim organima uglavnom djeluje lokalno kao tkivni čimbenik i antioksidant (Tan i sur.,

2003). Koncentracija melatonina u ostalim sekretornim tkivima, npr. u gastrointestinalnom traktu, često je puno viša nego u epifizi (Pandi-Perumal i sur., 2006).

Melatonin proizveden od strane ne-endokrinih organa nije reguliran cirkadijanim ciklusom već se javlja kao odgovor na druge signale, vršeći zapravo parakrini ili autokrini učinak (Carrillo-Vico i sur., 2004).

2.7.4. Razgradnja melatonina

Melatonin se primarno metabolizira u jetri, a sekundarno u bubrežima, dok se oko 5% melatonina izlučuje urinom u nepromijenjenom obliku (Karasek i Winczyk, 2006). Razgradnja melatonina prolazi kroz procese hidroksilacije i konjugacije. Melatonin se prvo hidroksilira na poziciji C6 pomoću enzima citokroma P450 (CYP1A2, CYP1A1), a zatim uslijedi reakcija konjugacije sa sulfatom ili glukuronidom do 6-hidroksimelatonin sulfata ili do 6-hidroksimelatonin glukuronida (slika 9.). Oko 90% melatonina se iz organizma izluči u obliku 6-hidroksimelatonin sulfata, dok se samo oko 10% melatonina izluči u obliku 6-hidroksimelatonin glukuronida (Karasek i Winczyk, 2006).



Slika 9. Razgradnja melatonina (Karasek i Winczyk, 2006)

Osim navedene razgradnje melatonina do 6-hidroksimelatonin sulfata i 6-hidroksimelatonin glukuronida, melatonin također tvori i neke minorne metabolite kao što su: ciklički 2-hidroksimelatonin, N-gama-acetil-N-2-formil-5-metoksikinurenamin i N-gama-acetil-5-metoksikinurenamin (Pandi-Perumal i sur., 2006).

U ekstrahepatičkim tkivima melatonin se metabolizira drugim putovima – deacetilira se do 5-hidroksitriptamina. Oksidativnim cijepanjem pirolskog prstena uz indolamin-2,3-dioksigenazu i/ili mijeloperoksidazu nastaje nestabilni kinuraminski derivat N1-acetil-N2-formil-5-metoksikinuramin (AFMK) koji se deformilira do stabilnijeg

N1-acetil-5-metoksikinuramina (AMK) uz kinuramin formamidazu. Ti metaboliti posjeduju antioksidativno i protuupalno djelovanje kao i sam melatonin (Pandi-Perumal i sur., 2006; Chowdhury i sur., 2008).

2.7.5. Uloga melatonina u regulaciji spolnog ciklusa ovaca

Hormon melatonin ima neizostavnu ulogu u regulaciji spolnog ciklusa sezonski poliestričnih vrsta životinja. Kao što je navedeno, njegova sekrecija i lučenje iz epifize proporcionalna je dužini mraka, stoga on pruža informaciju organizmu o promjeni sezone koja nastupa s promjenom dužine dnevnog osvjetljenja. Cirkadijani utjecaj melatonina posredovan je receptorima melatonina u suprahijazmičkoj jezgri hipotalamusa, mjestu cirkadijanog sata (Reppert i Weaver, 1995), dok je reproduksijski utjecaj melatonina posredovan receptorima melatonina u pars tuberalis hipofize (Reppert i sur., 1994). Promjene u duljini sekrecije melatonina tvore signal živčanim strukturama koje kontroliraju sekreciju gonadotropina iz hipofize, na način da duže trajanje sekrecije melatonina djeluje stimulativno, a kratko inhibitorno. Brojnim istraživanjima u kojima su životinje u anestrusu tretirane egzogenim melatoninom, dokazano je da neprekidno visoka razina melatonina u organizmu dovodi do aktivacije hipotalamo-hipofizne osi (GnRH/LH; Bittman i sur., 1983; Karsch i sur., 1984). Međutim, aktivacija gonadotropnog sustava u ovaca u anestrusu koja dovodi do pojave estrusa, zahtjeva nekoliko tjedana izloženosti melatoninu tijekom kojih promjena u povratnoj akciji estradiola na GnRH/LH ima središnju ulogu (Legan i sur., 1977).

Znanstvenici su intenzivno proučavali djelovanje egzogenog melatonina na poticanje reproduksijske aktivnosti ovaca izvan uobičajene sezone parenja. Uporaba egzogenog melatonina potiče raniji početak pripusne sezone ovaca za mjesec dana. U pasmina ovaca s umjerenih područja sjeverne Europe ($>45^{\circ}\text{N}$) implantati melatonina su se tradicijski koristili u vrijeme ljetnog solsticija s ciljem poticanja početka pripusne sezone (Nowak i Rodway, 1985; Haresign i sur., 1990), dok se u mediteranskih pasmina ovaca implantati upotrebljavaju ranije, tijekom proljetnog ekvinocija, jer mediteranske pasmine ulaze ranije u reprodukciju u odnosu na one koje potječu s viših zemljopisnih širina (Chemineau i sur., 1988). Uporaba melatoninskih implantata na tropskim i subtropskim područjima je ograničena iz razloga što većina ovaca uzgajanih na navedenim područjima ima cjelogodišnju mogućnost pripusta (Gómez-Brunet i sur., 2012). Uporaba implantata melatonina u španjolskih pasmina ovaca rezultirala je povećanjem veličine legla od 15 do 30% ovisno o istraživanoj pasmini, sustavu uzgoja i vremenu stavljanja implantata melatonina (Gómez-Brunet i sur., 2012). Međutim, ako se melatonin aplicira prerano (prije

ljetnog solsticija), ovce ne pokazuju raniju pripusnu aktivnost u odnosu na one netretirane melatoninom (Symons i sur., 1987).

Osim na poticanje ovaca na tjeranje izvan uobičajene sezone, uporaba egzogenog melatonina utječe na raniji ulazak ženske janjadi u pubertet. Primjena vaginalnih implantata melatonina u ženske janjadi, rođene u proljeće, u dobi od 19 tjedana (sredinom srpnja) pozitivno je utjecala na raniji ulazak janjadi u pubertet za 5,2 tjedna u odnosu na kontrolnu skupinu u koje se pubertet javio u dobi od 35,4 tjedna (Nowak i Rodway, 1985). Nasuprot navedenom, prerano stimuliranje janjadi na poticanje puberteta (sredinom svibnja), već s dobi janjadi od 7,5 tjedana nije rezultiralo s značajnije ranijim ulaskom janjadi u pubertet u odnosu na kontrolnu skupinu (Nowak i Rodway, 1985). Također, primjena sporo otpuštajućih ušnih implantata melatonina u janjadi i jaradi rođene u jesen početkom svibnja imala je pozitivan utjecaj na pojavu puberteta i početak pripusne sezone za 11 do 12 tjedana (Papachristoforou i sur., 2007).

Povećanjem duljine dana (fotoperioda), a time i količine svjetla, smanjuje se aktivnost epifize, odnosno izlučivanje melatonina i obrnuto. Rad epifize i njeno izlučivanje melatonina, tijekom godine, znatno se mijenja. U jesen, produživanjem razdoblja mraka, epifiza u ovaca povećava izlučivanje melatonina koji deblokira hipotalamus te počinje izlučivati gonadotropne oslobađajuće hormone (GnRH). GnRH djeluju na hipofizu koja počinje izlučivati folikulostimulirajući hormon (FSH). FSH potiče razvoj, odnosno rast Graafovi folikula na jajniku. Razvojem Graafovi folikuli na jajniku počinju proizvoditi estrogene (estradiol, estron, estriol), a oni uzrokuju estrus, odnosno promjene na spolnim organima i promjene ponašanja ženki (Rupić, 2010).

Intenzivna istraživanja, prvenstveno na razini mozga, koja su provedena posljednjih desetljeća imala su svrhu rasvijetliti načine djelovanja melatonina na GnRH/LH sekreciju te identificirati vezna mjesta melatonina. Uporaba auto radiografije i mikro-implantata omogućila je demonstraciju diskretnog područja koje visoko veže melatonin, a locirano je u premamilarnom području hipotalamusa, što omogućuje melatoninu stimulaciju LH sekrecije ako je dostavljen u navedeno područje (Malpaux i sur., 1998). Navedeno dokazuje da je premamilarno područje hipotalamusa važno ciljno mjesto djelovanja melatonina obzirom na reproduksijsku aktivnost ovaca.

Melatonin ima jak utjecaj na reprodukciju sisavaca koji se pare sezonski, ali i ljudi, vjerojatno zahvaljujući inhibiciji osi hipotalamus-hipofiza-gonade. Regulira ritam biosinteze čimbenika koji oslobađa gonadotropine (GnRH) iz hipotalamusa, čime kontrolira oslobađanje luteinizirajućeg hormona (LH) i folikul-stimulirajućeg hormona (FSH) te posljedično i funkciju gonada.

2.8. Receptori melatonina

Melatonin ima učinak u gotovo svim stanicama u organizmu, bilo preko receptora ili neovisno o njima. Poznata su četiri mehanizma djelovanja melatonina u sisavaca:

- vezanje na melatoninske receptore na membrani stanice;
- vezanje na tzv. *orphan* nuklearne receptore;
- vezanje na unutarstanične proteine poput kalmodulina i
- antioksidativno djelovanje (Altum i Ugur-Altum, 2007).

Obzirom na temu predmetnog istraživanja, u nastavku će jedino biti prikazano djelovanje melatonina vezanjem na melatoninske receptore na staničnoj membrani.

Melatonin u kralježnjaka regulira brojne biološke funkcije kroz tri različita podtipa G proteinskih receptora (GPCR – G protein-coupled receptors): MT1, MT2 i MTNR1C. Receptori MT1 i MT2 prisutni su u čovjeka i ostalih sisavaca, dok je dodatni melatoninski receptor MTNR1C identificiran u riba, vodozemaca i ptica (Li i sur., 2013). MT1 i MT2 podtipovi melatoninskog receptora klasificirani su obzirom na njihov pikomolarni (visoki) ili nanomolarni (niski) afinitet za 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin (Dubocovich, 1988; 1995). Melatoninski receptori istraživani su od 1917. godine kada su McCord i Allen demonstrirali svjetlucanje kože žabe (*Rana pipiens*) izazvano ekstraktima iz goveđe epifize. To dovodi do pretpostavke postojanja melatoninskih receptora (Heward i Hadley, 1975), uspostavljanja prvog odnosa strukture i aktivnosti melatoninskih analoga (Heward i Hadley, 1975) i dokazivanja da su melatoninski receptori povezani s G-proteinima (White i sur., 1987).

Prvi melatoninski receptor Mel_{1c} kloniran je iz mRNA *Xenopus laevis* (Ebisawa i sur., 1994), i iako taj receptor nema poznatog ortologa u sisavaca njegovo kloniranje je dovelo do otkrića nekoliko melatoninskih receptora u sisavaca (Reppert i sur., 1994, 1995). Prvi pokušaji identificiranja melatoninskih receptora u mozgu goveda uključuju [3H]melatonin kao radioligand za označavanje receptorskih mjesta u membranama goveđeg hipotalamusa (Cardinali i sur., 1979). No glavni preokret se dogodio kad su Vakkuri i sur. 1984. godine predstavili radioligand 2-[¹²⁵I]iodomelatonin. Njegova selektivnost i specifičnost prema melatoninu omogućila je daljni napredak u lokaliziranju i karakterizaciji receptora u tkivima.

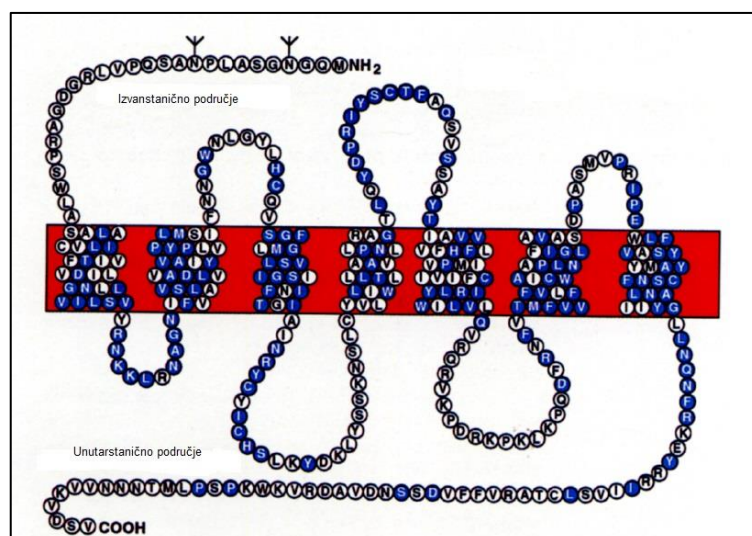
Prva klasifikacija melatoninskih receptora napravljena je na temelju njihovih kinetičkih i farmakoloških razlika na veznim mjestima 2-[¹²⁵I]iodomelatonina te razlikuje dva receptora ML₁ i ML₂ (Cardinali, 1981).

Sljedeća prekretnica je bilo kloniranje dva G-protein povezana melatoninska receptora u sisavaca. Prvotno nazvani Mel1a i Mel1b, a danas poznati kao MT₁ i MT₂. Ta dva melatoninska receptora su definirani kao jedinstveni tipovi na osnovi njihovih različitih molekularnih struktura i kromosomske pozicije (Reppert i sur., 1994).

Melatoninsko vezno mjesto u sisavaca MT₃ (ranije poznato kao ML₂) farmakološki se razlikuje od G-proteinskih receptora u sisavaca (Dubocovich, 1995) te su Nosjean i sur. (2000) otkrili da je protein quinone reduktaza II izolirana iz bubrega hrčka identična MT₃ veznom mjestu u mozgu hrčka.

Trenutačna IUPHAR (engl. *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) nomenklatura klasificira dva klonirana melatoninska receptora u dva tipa: MT₁ (prvobitno Mel_{1a}, MEL_{1A}, ML_{1A}), odnosno prvi klonirani melatoninski receptor u sisavaca (Reppert i sur., 1994) i MT₂ (prvobitno Mel_{1b}, MEL_{1B}, ML_{1B}), odnosno drugi klonirani melatoninski receptor u sisavaca (Reppert i sur., 1995; Dubocovich i sur., 2010). Dugo se smatralo da ovce imaju samo jedan melatoninski receptor (MT₁), sve dok Cogé i sur. (2009) nisu klonirali i drugi melatoninski receptor (MT₂) u ovaca.

Receptori melatonina MT1 i MT2 obuhvaćaju vlastitu subgrupu unutar superobitelji receptora povezanih s G-proteinima (GPCR). Oba melatoninska receptora imaju osnovnu strukturu sastavljenu od sedam transmembranskih razgranatih α -uvojitih segmenata spojenih na naizmjenične unutarstanične i izvanstanične petlje (slika 10.), s amino (NH₂) završetkom smještenim s izvanstanične strane i karboksi (COOH) krajem s unutarstanične strane (Dubocovich i sur., 2010). Prijenos signala kod oba receptora ide preko G_i proteina koji uzrokuje smanjenje koncentracije cAMP-a, nakon čega se smanjuje aktivnost PKA i CREB fosforilacije (Godson i Reppert, 1997; Dubocovich i sur., 2003).



Slika 10. Membranska topologija ljudskog MT1 receptora. Plava boja označava aminokiseline identične za sva tri podtipa receptora (Reppert i Weaver, 1995)

Ukupna sličnost aminokiselina receptora ovce i čovjeka je 80%, a sličnost unutar transmembranskih domena je 87%. Navedena sličnost sugerira kako su klonovi čovjeka i ovaca homologni na razini vrste istog receptora (Reppert i sur., 1994).

Prvotno je smatrano da su receptori koji vežu melatonin primarno povezani sa stanicama u suprahiazmatičnoj jezgri (SCN) prednjeg hipotalamusa (Reppert i sur., 1994). Iako stanice SCN sadrže velik broj melatoninskih receptora, oni su još više raspoređeni, ne samo u mozgu, već i u mnogim drugim organima (Witt-Enderby i sur., 2006). Navedene spoznaje sugeriraju da je djelovanje melatonina vrlo rašireno.

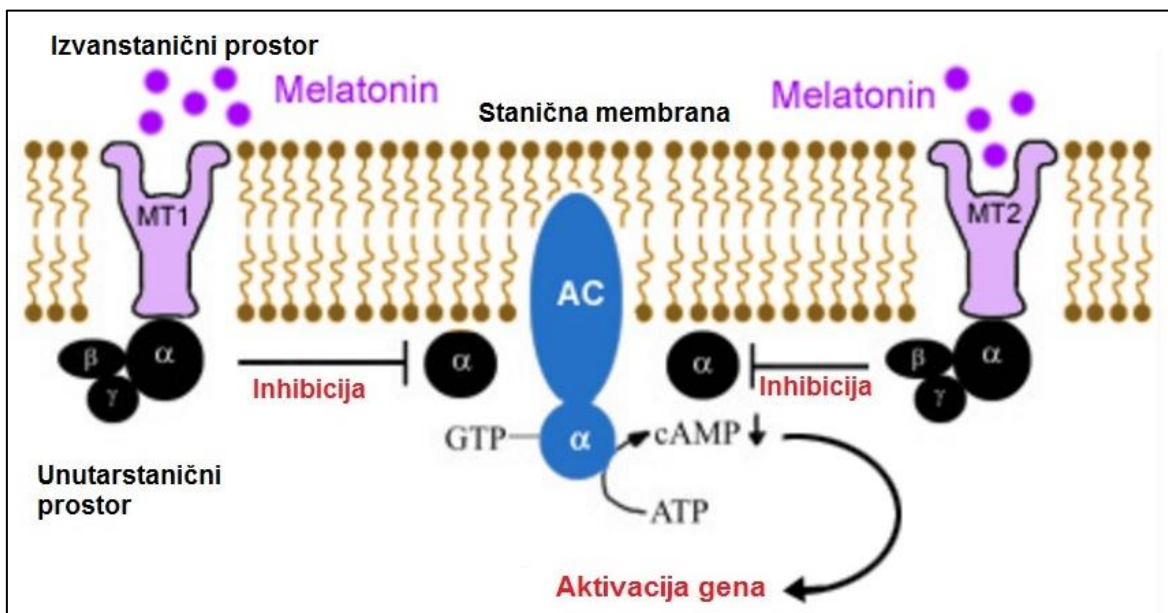
U mnogih sisavaca MT1 i MT2 melatoninski receptori diskretno su raspoređeni u područjima središnjeg živčanog sustava i perifernim tkivima, kao što su mrežnica, cerebralne i periferne arterije, bubrezi, gušterača, kora nadbubrežne žlijezde, koža, miometrij, placenta, granulosa i lutealne stanice, testisi i imunološke stanice (Dubocovich i Markowska, 2005).

2.8.1. Receptori vezani na G-proteine

Najveća porodica receptora na površini stanice prenosi signale do unutarstaničnih ciljeva posredstvom proteina koji vežu gvanin-nukleotid, nazvanih G-proteinima. Identificirano je više od 1 000 receptora povezanih s G-proteinima, uključujući receptore za eikozanoide, mnoge neurotransmitere, neuropeptide i peptidne hormone (Cooper i Hausman, 2004). Receptori povezani s G-proteinima strukturno su i funkcionalno srodni proteini, čija je osobina sedam membranskih α -uzvojnica koje prolaze kroz staničnu membranu (slika 11.).

Vezanje liganda za izvanstaničnu domenu receptora započinje konfiguracionu promjenu koja omogućuje vezanje citosolne domene receptora za G-protein povezan s unutrašnjim stranom stanične membrane. Ovo međudjelovanje aktivira G-protein, koji se potom odvaja od receptora i prenosi signal do unutarstaničnog cilja, koji može biti enzim ili ionski kanal (Cooper i Hausman, 2004). G-proteini se sastoje od tri podjedinice, označene kao α , β i γ (slika 11.). Često ih se naziva heterotrimernim G-proteinima, kako bi ih se razlikovalo od drugih proteina koji vežu gvanin-nukleotid. Gvanin-nukleotidi koji nadziru aktivnost G-proteina, vežu se na α -podjedinicu. U mirovanju, α -podjedinica vezana je za GDP u kompleksu s β - i γ -podjedinicama. Vezanje hormona uzrokuje konformacijsku promjenu receptora, tako da dolazi do međudjelovanja citosolne domene receptora s G-proteinom te se potiče otpuštanje vezanog GDP u zamjenu za GTP. Aktivna podjedinica α , za koju je vezan GTP, disocira od β - i γ -podjedinica, koje ostaju povezane i djeluju kao $\beta\gamma$ -kompleks. Potom aktivna α -podjedinica, za koju je vezan GTP, i $\beta\gamma$ -kompleks djeluju na svoje ciljeve kako bi izazvali unutarstanični odgovor. Aktivnost

α -podjedinice prestaje hidrolizom vezanoga GTP te se inaktivira α -podjedinica (uz koju je sada vezan GTP) ponovno spaja s $\beta\gamma$ -kompleksom kako bi ciklus mogao početi iz početka (Cooper i Hausman, 2004).



Slika 11. Ulazak melatonina u stanicu pomoću MT1 i MT2 melatoninskih receptora.

MT1/MT2 – melatoninski receptori; $\beta\gamma$ – podjedinice G-proteinskog receptora;

AC - enzim adenilat ciklaza; GTP – gvanozin trifosfat; ATP – adenozin trifosfat; cAMP – ciklički adenozin monofosfat (izvor: <http://www.egbeck.de/melatde.htm>)

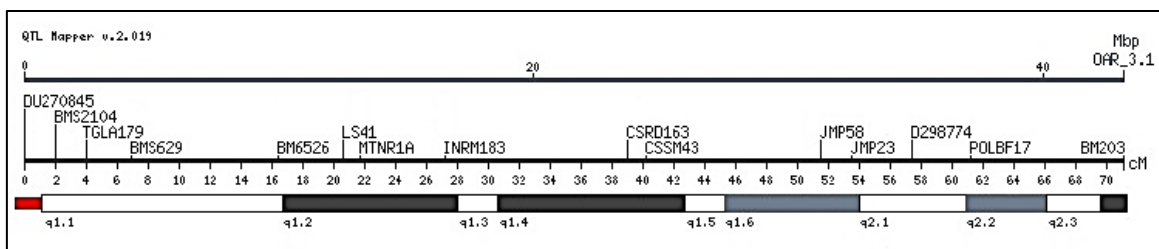
2.9. Polimorfizam MTNR1A gena

Polimorfizam je pojava kada su u populaciji na jednom lokusu prisutna dva ili više alela s frekvencijom većom od 1%, dok se promjenu jednog baznog para (nukleotida) genomske DNK na specifičnom lokusu naziva točkasta mutacija (SNP; engl. *single nucleotide polymorphism*). U prosjeku SNP se javlja svakih 1330 baznih parova u ljudskom genomu te je tako svaka jedinka definirana SNP-ovima jedinstvena (Krebs i sur., 2014).

2.9.1. Pozicija polimorfizma

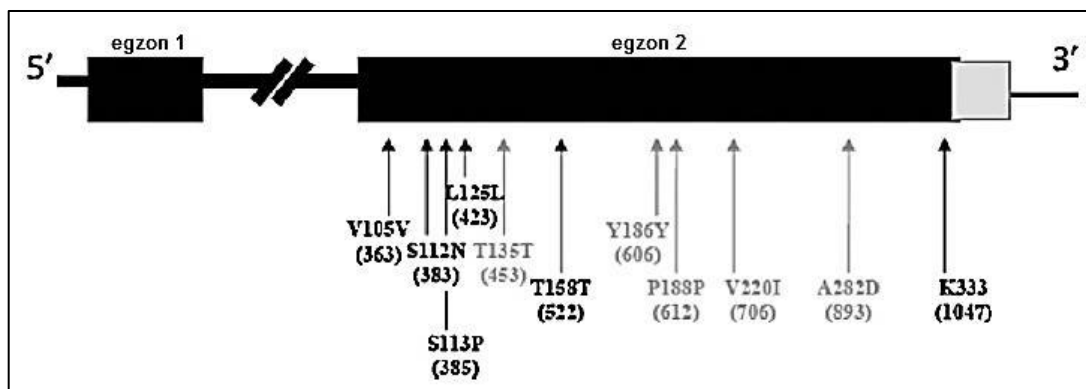
Melatonin receptor 1A gen (MTNR1A) mapiran je u čovjeka na kromosomu 4q35.1, proksimalnom dijelu kromosoma 8 u miša (Slaugenhaupt i sur., 1995), kromosomu 17q1.2 u svinje, kromosomu 26 u ovaca te kromosomu 27 u goveda (Messer i sur., 1997). U ovaca se navedeni gen nalazi između mikrosatelita CSSM43 i BM6526,

distalno u odnosu na BM6526 (slika 12.; Messer i sur., 1997), a sastoji se od dva egzona podijeljena s intronom dužine oko 8 kb (kilo baza; Reppert i sur., 1994; slika 13.).



Slika 12. Smještaj MTNR1A gena na 26. kromosomu ovce

Egzon I kodira prvu transmembransku domenu i prvu unutarstaničnu petlju te pokazuje nizak stupanj polimorfizma (Barrett i sur., 1997; Trecherel i sur., 2010), dok je preostali dio receptora sadržan unutar većeg egzona II (Barrett i sur., 1997). Egzon II MTNR1A gena, koji kodira ovčji MT1 receptor, visoko je polimorfan (Barrett i sur., 1997; Messer i sur., 1997; Pelletier i sur., 2000) te posjeduje dva polimorfna (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*) mjesta na pozicijama 606 i 612 referentne sekvence U14109 (Reppert i sur., 1994), od toga jedno za *RsaI* (pozicija 606), a drugo za *MnII* (pozicija 612) restriksijsku endonukleazu. Polimorfizam na poziciji 606 očituje se prisutnošću citozina (C) umjesto timina (T) (C606T), dok je polimorfizam na poziciji 612 prouzročen prisutnošću gvanina (G) umjesto adenina (A) (G612A).



Slika 13. Shematski prikaz ovčjeg MTNR1A gena s pozicijama polimorfizama označenih strelicama (Martínez-Royo i sur., 2012)

2.9.2. Frekvencije alela i genotipova MTNR1A gena

Frekvencije CC i GG genotipova su više, dok su frekvencije TT i AA genotipova niže u poliestričnih pasmina u odnosu na sezonski poliestrične pasmine ovaca, što potvrđuje povezanost CC i GG genotipova i nesezonske pojave estrusa te TT i AA

genotipova i sezonske pojave estrusa u ovaca (Chu i sur., 2006). Reprodukcijska sposobnost ovaca GG genotipa tijekom dužega fotoperioda uspješnija je u odnosu na ovce AA genotipa (Pelletier i sur., 2000; Mateescu i sur., 2009). Divlje i primitivnije domaće sezonski poliestrične pasmine, u pravilu, imaju više frekvencije AA genotipa (Carcangiu i sur., 2010). Polimorfizam na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena analiziran je u mnogih različitih pasmina ovaca širom svijeta, a frekvencije alela i genotipova nekih pasmina ovaca prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Frekvencije alela i genotipova na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena ovaca

Pasmina	Frekvencije alela				Frekvencije genotipova						Literaturni izvor
	Lokus 606		Lokus 612		Lokus 606			Lokus 612			
	C (R)	T (r)	G (M)	A (m)	CC (RR)	CT (Rr)	TT (rr)	GG (MM)	GA (Mm)	AA (mm)	
Malpura	0,94	0,06	0,87	0,13	0,874	0,121	0,004	0,752	0,229	0,017	Sexena i sur., 2015
Patanwadi	0,72	0,18	0,79	0,21	0,522	0,245	0,029	0,625	0,330	0,044	
Sandyno	0,46	0,54	0,85	0,15	0,213	0,497	0,289	0,716	0,260	0,024	
Nilgiri	0,56	0,44	0,72	0,28	0,314	0,492	0,192	0,524	0,399	0,076	
Chokla	0,87	0,13	0,88	0,12	0,757	0,226	0,017	0,774	0,211	0,014	Sexena i sur., 2014
RA	0,87	0,13	0,51	0,49	–	–	–	–	–	–	Martínez-Royo i sur., 2012
Sarda	–	–	0,77	0,23	–	–	–	0,68	0,19	0,13	Carcangiu i sur., 2011
Sarda	–	–	–	–	0,53	0,30	0,17	0,62	0,19	0,19	Mura i sur., 2010
Muflon	–	–	0,34	0,66	–	–	–	0,18	0,32	0,50	Carcangiu i sur., 2010
Sarda	0,66	0,34	0,78	0,22	0,535	0,26	0,205	0,68	0,205	0,115	Carcangiu i sur., 2009
Dorset	0,35	0,65	0,64	0,36	0,13	0,43	0,44	0,43	0,44	0,13	Mateescu i sur., 2009
STH	0,71	0,29	0,75	0,25	0,46	0,50	0,04	0,52	0,47	0,01	Chu i sur., 2006
Hu	0,65	0,35	0,80	0,20	0,41	0,48	0,11	0,63	0,33	0,04	
Suffolk	0,42	0,58	0,56	0,44	0,04	0,75	0,21	0,33	0,46	0,21	
Dorset	0,48	0,52	0,57	0,43	0,13	0,70	0,17	0,23	0,67	0,10	
GMM	0,48	0,52	0,55	0,45	0,24	0,48	0,28	0,19	0,71	0,10	

RA – Rasa Aragonesa; STH – Small Tail Han; GMM – German Mutton Merino

Iz tablice 1. je vidljiva znatna raznolikost alela i genotipova na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena u različitim pasmina ovaca. Navedeni rezultati sugeriraju da se pasmine s visokim udjelima C i G alela (C606 i G612) nalaze pod određenom selekcijom, u svrhu reduciranja sezonosti reprodukcije. Chu i sur. (2006) utvrdili su značajno veće frekvencije C alela u poliestričnih (ne-sezonskih) pasmina ovaca (Small Tail Han i Hu pasmine) u odnosu na sezonski poliestrične pasmine (Suffolk, Dorset i German Mutton Merino). Povezanost CC genotipa i cjelogodišnje reproduksijske aktivnosti u Sarda pasmine utvrdili su Carcangiu i sur. (2009). Sexena i sur. (2015) navode veće frekvencije T alela na lokusu 606 u pasmina ovaca subumjerenog područja u odnosu na pasmine ovca suptropskog područja, dok se frekvencije G i A alela na lokusu 612 nisu značajnije razlikovale između istraživanih pasmina.

Notter i sur. (2003) tvrde da je samo jedan G alel dovoljan za utjecaj na sezonost reproduksijske aktivnosti nekoliko pasmina ovaca iz Sjeverne Amerike. Važnost genotipa za reproduksijski odgovor na tretman melatoninom utvrdili su Mura i sur. (2010), pokazujući da su životinje GG genotipa osjetljivije na implantate melatonina. Navedeni autori pretpostavljaju da su životinje GG genotipa osjetljivije na djelovanje melatonina te da im je potrebno kraće vrijeme stimulacije za postizanje početka reproduksijske aktivnosti, dok životinje AA genotipa možebitno vežu veće količine melatonina, ali je, isto tako, moguće da je prijenos signala nižeg intenziteta te takve životinje trebaju dužu izloženost melatoninu. Navedene bi pretpostavke objasnile jaku vezu između AA genotipa i fotoperioda, budući da životinje AA genotipa trebaju visoke i dugotrajne vrijednosti melatonina u krvi da bi bile stimulirane kratkim fotoperiodom. Carcangiu i sur. (2011) tvrde da polimorfizam na MTNR1A genu može modificirati utjecaj melatonina na jajnik. Zbog prisutnosti melatoninskih receptora u granulosa stanicama jajnika, moguće je da je utjecaj melatonina na jajnike povećan u ovaca s GG genotipom, što rezultira većom plodnošću tijekom dužeg fotoperioda.

2.9.3. Mutacije na drugom egzonu MTNR1A gena

Mutacija na poziciji 612 odgovorna za izostanak *MnII* restrikcijskoga mjesta uvijek je povezana s tri preostale mutacije na pozicijama 453, 706 i 891 u m/m genotipa (Pelletier i sur., 2000; Chu i sur., 2006; tablica 2.). Mutacije na pozicijama 706 i 893 dovode do promjene aminokiseline na pozicijama 220 i 282, ali one nisu dio transmembranske domene MT1 melatoninskoga receptora i ne bi trebale mijenjati funkcionalnost receptora (Barrett i sur., 2003). Navedene promjene u aminokiselinama (V220I; A282D), osim u Merino d' Arles (Pelletier i sur., 2000), pronađene su i u Sarda (Carcangiu i sur., 2009) te pasmine Rasa Aragonesa (Martínez-Royo i sur., 2012).

Carcangiu i sur. (2009) i Sexena i sur. (2015) utvrdili su osam, a Chu i sur. (2006) pet mutacija identičnih s mutacijama prikazanim u tablici 2., dok su Martínez-Royo i sur. (2012) utvrdili samo tri identične mutacije te osam novih mutacija koje odgovaraju pozicijama 363, 383, 385, 423, 453, 522, 706 i 1047 referentne sekvence U14109 u španjolske pasmine Rasa Aragonesa. Sexena i sur. (2015) uz navedenih osam mutacija, utvrdili su postojanje mutacije na poziciji 453 kao i Martínez-Royo i sur. (2012) te mutaciju na poziciji 675 u indijske Nilgiri pasmine koja nije potvrđena ni u jedne druge pasmine ovaca.

Tablica 2. Pozicije mutacija te promjene baza i aminokiseline MTNR1A gena ovaca (Pelletier i sur., 2000)

Pozicija mutacije	Promjena baze	Promjena aminokiseline i pozicija*
426	C → T	Nema
456	G → T	Nema
555	G → A	Nema
606	C → T	Nema
612	G → A	Nema
706	G → A	Val → Ile 220
783	G → A	Nema
801	G → A	Nema
891	C → T	Nema
893	C → A	Ala → Asp 282

*Pozicija baze ili aminokiseline prema Reppert i sur. (1994).

Nekonzervativna mutacija na poziciji 706, u jedinkama nositeljicama A alelne varijante, uzrokuje promjenu aminokiseline valin u aminokiselinu izoleucin na poziciji 220 aminokiselinske sekvence (V220I) locirane u petoj transmembranskoj domeni receptora (Pelletier i sur., 2000). Prisutnost navedene nekonzervativne mutacije u A alela sugerira da životinje nositeljice AA genotipa ekspresiraju melatonin receptor (MT₁Ile²²⁰) koji je strukturno različit od receptora ekspresiranog u životinja nositeljice GG genotipa (MT₁Val²²⁰; Pelletier i sur., 2000). Međutim, mehanizam na koji polimorfizam MTNR1A gena utječe na izvansezonsko rasplodivanje još uvijek nije dovoljno istražen. Poznato je da su melatoninski receptori ekspresirani u GG i AA životinja funkcionalno različiti u pogledu signalizacije cAMP (Trecherel i sur., 2010).

3. MATERIJAL I METODE RADA

3.1. Biološki materijal

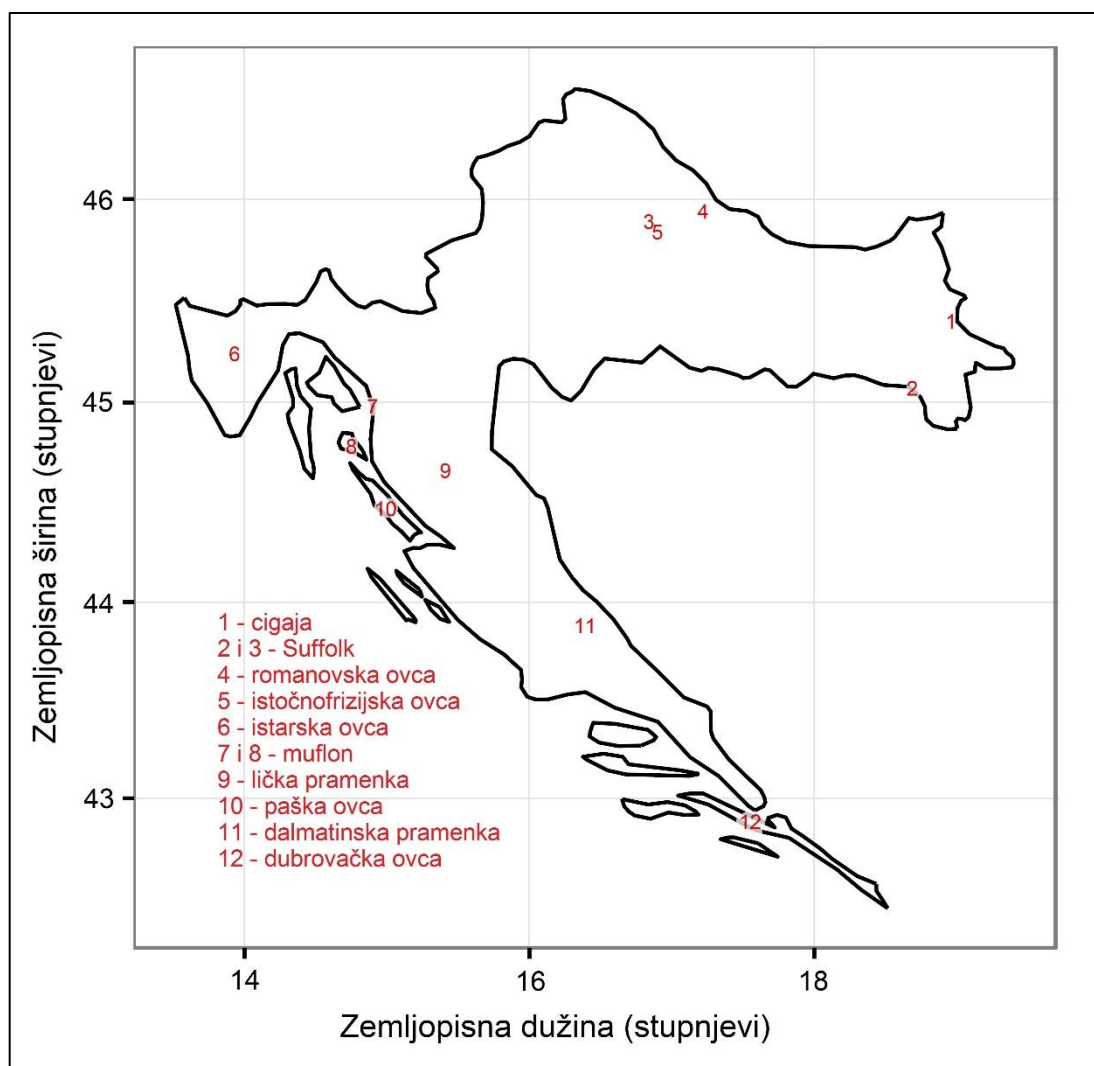
Istraživanja su provedena tijekom 2015. i 2016. godine na ukupno 439 uzorka biološkog materijala, od toga je bilo 30 uzoraka Europskog muflona (*Ovis musimon*) i 409 uzoraka 10 pasmina ovaca. Istraživane pasmine ovaca birane su prema spoznajama o učestalosti ponavljanja spolnog ciklusa tijekom godine. Sedam pasmina pripadalo je autohtonim pasminama u tipu pramenke koje odlikuje izrazita sezonska pojava spolnog ciklusa (tipične sezonski poliestrične pasmine): cigaja (31 uzorak), dalmatinska pramenka (40 uzoraka), dubrovačka ovca (32 uzoraka), istarska ovca (30 uzoraka), lička pramenka (50 uzoraka) i paška ovca (61 uzorak) te slovenska autohtona pasmina: bovška ovca (60 uzoraka). Tri istraživanjem obuhvaćene inozemne oplemenjene pasmine ovaca koje se uzgajaju u Hrvatskoj su: romanovska ovca (32 uzorka), istočnofrizijska ovca (38 uzoraka) i Suffolk (35 uzoraka) koje odlikuje produženo razdoblje pripusne sezone (tablica 3.).

Tablica 3. Broj uzoraka i lokacija po istraživanoj populaciji

Pasmina	Broj uzoraka	Tip uzorka	Broj stada	Lokacija
Muflon	30	krv, tkivo	2 lovišta	Senj, Rab
Bovška ovca	60	krv	više stada	Bovec
Cigaja	31	dlaka	1 stado	Borovo
Dalmatinska pramenka	40	tkivo	1 stado	Maovice
Dubrovačka ovca	32	dlaka	više stada	Pelješac
Istarska ovca	30	dlaka	više stada	poluotok Istra
Istočnofrizijska ovca	38	dlaka	1 stado	Kokinac
Lička pramenka	50	dlaka	1 stado	Konjsko brdo
Paška ovca	61	krv, tkivo	više stada	otok Pag
Romanovska ovca	32	dlaka	1 stado	Pitomača
Suffolk	35	dlaka	2 stada	Županja, Bjelovar
Ukupan broj uzoraka	439			

Prikupljanja biološkog materijala koji su činili uzorci dlake, krvi i tkiva provedena su na području Republike Hrvatske i Republike Slovenije, u područjima uzgoja pojedinih pasmina ovaca. Uzorci dlake su uzimani sa čeonog (*os frontalis*) područja glave ovce, spremljeni u papirnate omotnice te čuvani do izolacije DNK na sobnoj temperaturi. Krv je uzimana iz jugularne vene (*vena jugularis*) u količini od 7 ml u epruvete s EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina) kao antikoagulansom i čuvana do izolacije DNK u zamrzivaču na temperaturi od -20°C . Tkivo je uzimano s ruba uha, spremano u 0,5 ml tubice te do analiza čuvano u zamrzivaču na temperaturi od -20°C . Broj prikupljenih

uzoraka, tip prikupljenog uzorka te lokacija prikupljanja po pojedinim pasminama prikazani su u tablici 3. i slici 14.



Slika 14. Područja prikupljanja uzoraka muflona i pasmina ovaca uzgajanih u Republici Hrvatskoj

3.2. Reprodukcijski pokazatelji

Pri prikupljanju biološkog materijala istraživanih pasmina ovaca, prikupljeni su reprodukcijski pokazatelji za dio jedinki obzirom da pojedina grla nisu bila obuhvaćena matičnom evidencijom. Reprodukcijski pokazatelji prikupljeni su izravno od uzgajivača ovaca i/ili preuzeti iz središnje baze podataka Hrvatske poljoprivredne agencije (HPA).

Prikupljeni podaci obuhvaćali su:

— datum rođenja istraživane jedinke,

- tip janjenja istraživane jedinke (samac, blizanac, trojak),
- datum janjenja pojedine ovce.

Iz prikupljenih podataka utvrđena je sezona rođenja istraživanih jedinki i sezona u kojoj se pojedina ovca ojanjila. Godina je podijeljena na četiri sezone i to: proljeće, ljeto, jesen i zimu, a vremenska razdoblja pojedine sezone bila su sljedeća: proljeće (21.03.-20.06.), ljeto (21.06.-20.09.), jesen (21.09.-20.12.) i zima (21.12.-20.03.).

Dob pri prvom janjenju, izražena u danima, izračunata je kao razlika između datuma rođenja i datuma prvog janjenja.

Prosječna dužina međujanjidbenog razdoblja, izražena u danima, izračunata je na način da su međujanjidbena razdoblja između prvog i drugog, drugog i trećeg, trećeg i četvrtog i svakog sljedećeg janjenja zbrojena te podijeljena s ukupnim brojem janjenja pojedine ovce. Dužina međujanjidbenog razdoblja između prvog i drugog, drugog i trećeg te svakog sljedećeg janjenja izračunata je kao razlika između datuma drugog i prvog janjenja, trećeg i drugog janjenja, itd.

3.3. Izolacija genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNK)

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

3.3.1. Postupak izolacije DNK iz dlake

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

1. Priprema uzorka za izolaciju
 - a. od svakog uzorka korišteno je minimalno 50 dlaka od kojih su laboratorijskim škalicama odrezani korijeni i stavljeni u tubice od 1,5 mL.
2. Razgradnja korijena dlake
 - a. u 1,5 mL tubicu s pripremljenim korijenima dlake dodano je 180 µL Lysis otopine T (B6678) i 20 µL otopine proteinaze K;

- b. smjesa je snažno protresena te stavljena na inkubaciju tijekom noći na temperaturu od 55°C uz tresenje na 600 rcf na uređaju Eppendorf Thermomixer comfort.
3. Raspadanje stanice (engl. *Lyse cells*)
 - a. sljedeće jutro smjesi je dodano 200 µL Lysis otopine C (B8803), nakon čega je otopina snažno protresena u trajanju od 15 sekundi.
4. Priprema kolona
 - a. u tubice s kolonama od 2 mL (GenElute Miniprep Binding Column) dodano je 500 µL otopine za pripremu kolona, a zatim su tubice centrifugirane u trajanju od 1 minute na 12 000 rcf;
 - b. nakon centrifugiranja tekući sadržaj iz tubica je odbačen i kolone su spremne za nastavak izolacije DNK.
5. Priprema za vezivanje
 - a. u tubu s uzorkom dodano je 200 µL hladnog 96% etanola (čuvan na -20°C), smjesa je snažno protresena u trajanju od 10 sekundi sa svrhom dobivanja homogene smjese.
6. Premještanje smjese lizata
 - a. s pipetom od 1 000 µL sav sadržaj lizata iz 1,5 mL tubica je premješten u prethodno pripremljene 2,0 mL tubice s kolonama;
 - b. zatim je uslijedilo centrifugiranje 1 minutu na 6 600 rcf;
 - c. po završetku centrifugiranja kolone su prebačene u čiste 2,0 mL tubice.
7. Prvo ispiranje
 - a. u svaku kolonu dodano je 500 µL otopine za ispiranje (Wash Solution), nakon čega je uslijedilo centrifugiranje 1 minutu na 6 600 rcf;
 - b. po završetku centrifugiranja kolone su prebačene u čiste 2,0 mL tubice.
8. Drugo ispiranje
 - a. ponovno je u svaku kolonu dodano 500 µL otopine za ispiranje nakon čega je uslijedilo centrifugiranje od 3 minute na 14 000 rcf;
 - b. po završetku centrifugiranja kolone su prebačene u čiste 2,0 mL tubice.
9. Otapanje DNK
 - a. u svaku kolonu dodano je 80 µL otopine za otapanje DNK (Elution Solution), nakon inkubacije u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 1 minutu na 6 600 rcf;
 - b. nakon toga postupak je ponovljen s ciljem dobivanja veće količine DNK.

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

3.3.2. Postupak izolacije DNK iz krvi

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

3.3.3. Postupak izolacije DNK iz tkiva

Prije početka izolacije, od svakog zamrznutog uzorka tkiva bez odleđivanja, odrezan je komadić promjera oko 5 mm i smješten u 1,5 mL tubicu. Svi koraci izolacije DNK iz tkiva i korišteni volumeni otopina bili su identični onima opisanim u postupku izolacije DNK iz dlake, izuzev koraka 3 (raspadanje stanica) u kojem je nakon dodavanja 200 μ L Lysis otopine C (B8803) i snažnog tresenja u trajanju od 15 sekundi smjesa inkubirana 10 minuta na 70°C.

3.4. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Umnožavanje ciljne sekvence DNK drugog egzona MTNR1A gena provedeno je postupkom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*; PCR) prema protokolu proizvođača s GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). PCR je proveden u ukupnom volumenu od 25 μ L uključujući:

- 8,5 μ L vode slobodne od nukleaza;
- 12,5 μ L GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix;
- 1,0 μ L začetnog oligonukleotida prema naprijed (engl. *forward*) 10 μ M;
- 1,0 μ L začetnog oligonukleotida prema natrag (engl. *reverse*) 10 μ M;
- 2,0 μ L tj. 50 ng genomske DNK.

U PCR reakciji korišteni su sljedeći začetni oligonukleotidi (Sigma-Aldrich) preuzeti od Messer i sur. (1997) koji su omogućili amplifikaciju sekvence glavnog dijela drugog egzona MTNR1A gena (GenBank Acc. No. U14109) duljine 824 parova baza (Reppert i sur., 1994):

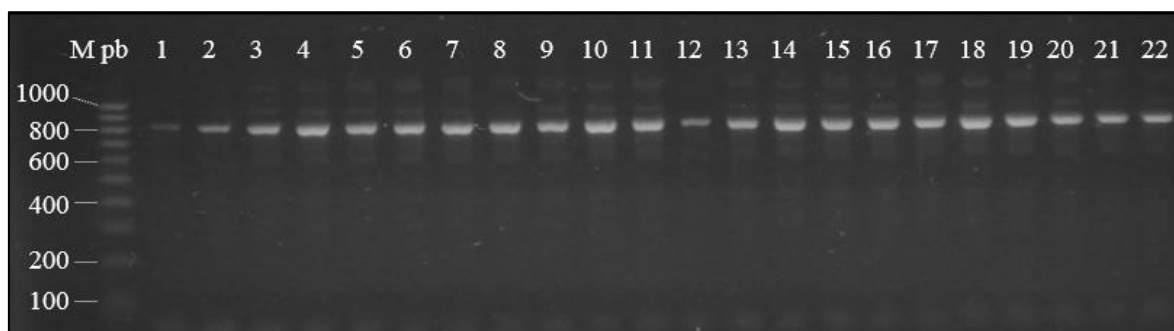
- začetni oligonukleotid prema naprijed: 5'-TGTGTTTGTGGTGAGCCTGG-3';
- začetni oligonukleotid prema natrag: 3'-ATTTGCGTTTGGGAGAGGTA-5'.

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

- reakcija aktivacije Taq polimeraze na 94°C/5 minuta;
- denaturacija 94°C/30 sekundi,
- priličanje začetnih oligonukleotida 55°C/30 sekundi;
- produljenje DNK lanca 72°C/45 sekundi;
- krajnje produljenje multiplicirane željene sekvence DNK na 72°C/5 minuta;
- hlađenje na 4°C.

35 ciklusa
umnažanja ciljnog
DNK odsječka

Kontrola uspješnosti amplifikacije PCR produkata vršena je na 1% agaroznom gelu pomoću gel elektroforeze. Za izradu gela korišteno je 0,75 g agaroze i 75 mL 1x TBE pufera (0,5 M Tris baza, 0,5 M borna kiselina, 10 mM EDTA), zagrijanih do ključanja u koje je nakon hlađenja gela na 60°C dodano oko 3 µL etidijevog bromida. U jažice na gelu dodano je 5 µL PCR produkta paralelno s standardom od 100 parova baza. Prilikom stavljanja uzoraka u jažice na gelu nije korišten aplikacijski pufer budući da ga sadrži korišteni GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega). Elektroforeza je trajala 60 minuta na 100 V. Vizualizacija (slika 15.) je provedena pomoću etidij bromida (EtBr) osvjetljavanjem gela ultraljubičastim (UV) svjetlom na UV transiluminatoru (Biorad).



Slika 15. Amplifikacija drugog egzona MTNR1A gena duljine 824 parova baza (pb) lančanom reakcijom polimeraze (PCR) u ovaca. M – standard razmaka 100 pb, 1-22 – PCR amplificirani produkt.

3.5. Determinacija polimorfizama MTNR1A gena

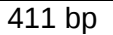
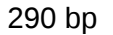
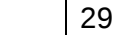
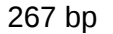
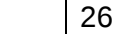
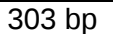
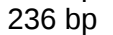
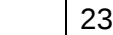
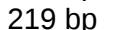
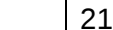
Determinacija MTNR1A alelnih varijanti obavljena je cijepanjem PCR produkta s *RsaI* i *MnII* restrikcijskim endonukleazama. Reakcijski miks za restrikcijsku razgradnju PCR produkata imao je ukupni volumen od 20 μ L, sadržavajući 10 μ L PCR produkta i 10 μ L reakcijskog miksa pojedine restrikcijske endonukleaze (tablica 4.).

Tablica 4. Reakcijski miks za *RsaI* i *MnII* restrikcijsku endonukleazu

<i>RsaI</i> reakcijski miks	<i>MnII</i> reakcijski miks
5,85 μ L demineralizirane vode	6,88 μ L demineralizirane vode
2,0 μ L 10 x pufer T	3,0 μ L 10 x NEB pufer
2,0 μ L 0,1% BSA	0,12 μ L <i>MnII</i> 5U
0,12 μ L <i>RsaI</i> 1U	

Nakon miješanja 10 μ L reakcijskog miksa pojedine restrikcijske endonukleaze i 10 μ L PCR produkta uzorci su stavljeni na inkubaciju u vodenu kupelj (Grant SUB Aqua Pro SAP12, Cambridge, England) u trajanju od 5 sati na 37°C. Mjesta na kojima enzimi sijeku DNK sekvencu su: 5'-GT[^]AC-3' za *RsaI* te 5'-CCTC(n)7[^]-3' i 3'-GGAG(n)6[^]-5' za *MnII* restrikcijsku endonukleazu. Cijepanje sekvence glavnog dijela drugog egzona MTNR1A gena s *RsaI* i *MnII* restrikcijskim endonukleazama na navedenim mjestima omogućilo je identifikaciju polimorfizama na poziciji 606 i 612 referentne sekvence MTNR1A gena (GenBank Acc. No. U14109). Genotipizacija uzoraka provedena je prema shematskom prikazu u tablici 5.

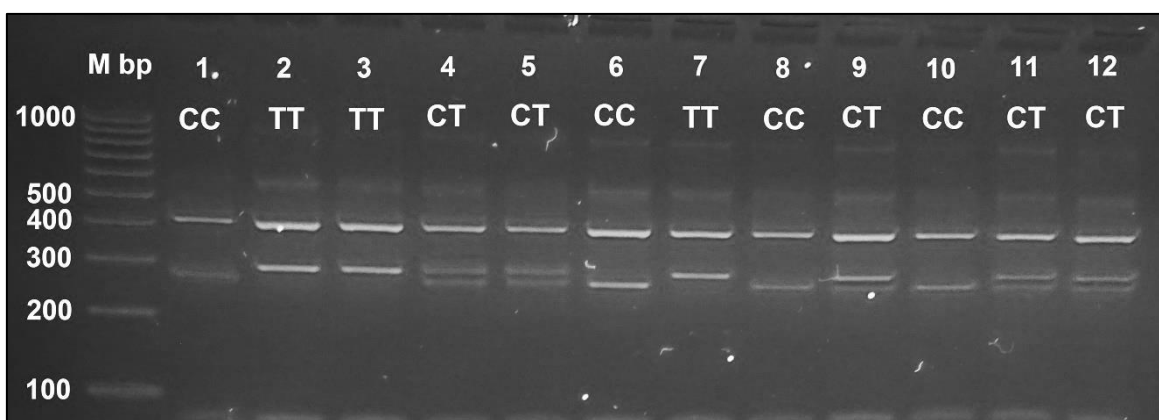
Tablica 5. Genotipizacija uzoraka na temelju polimorfizama MTNR1A gena

Pozicija polimorfizma 606	Genotipovi utvrđeni s <i>RsaI</i> restrikcijskom endonukleazom		
	CC	CT	TT
	411 bp 	411 bp 	411 bp 
	290 bp 	290 bp 	290 bp 
	267 bp 	267 bp 	267 bp 
Pozicija polimorfizma 612	Genotipovi utvrđeni s <i>MnII</i> restrikcijskom endonukleazom		
	GG	GA	AA
	303 bp 	303 bp 	303 bp 
	236 bp 	236 bp 	236 bp 
	219 bp 	219 bp 	219 bp 

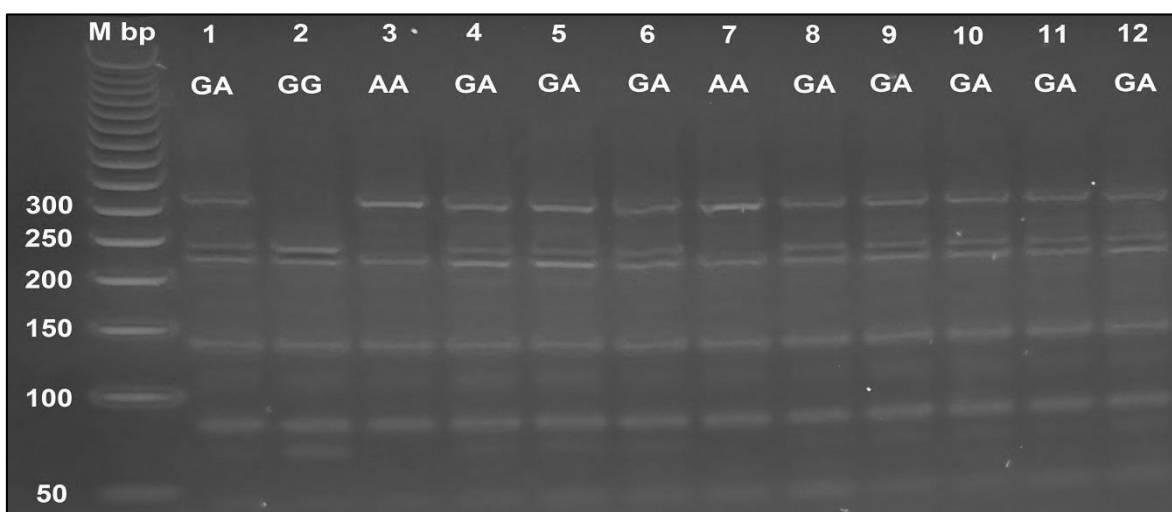
Rezultati uspješnosti enzimatskog cijepanja PCR produkata analizirani su na 3% gelu agaroze pomoću gel elektroforeze. Za izradu gela korišteno je 3,37 g agaroze i 112 ml 1 x TBE pufera (0,5 M Tris baza, 0,5 M borna kiselina, 10 mM EDTA), zagrijanih do ključanja u koje je nakon hlađenja gela na 60°C dodano oko 5 μ L etidijevog bromida. U

jažice na gelu stavljen je cijeli volumen restrikcijske razgradnje (20 μ L), a elektroforeza je puštena na 100 V dva sata. Vizualizacija uzoraka na agaroznom gelu provedena je s etidij bromidom pod UV svjetlom transiluminatora.

Razgradnjom PCR produkta s *RsaI* restrikcijskom endonukleazom, vizualizacija fragmenta duljine 267 bp označava polimorfizam i prisutnost citozina (C) na poziciji 606, dok vizualizacija fragmenta duljine 290 bp označava izostanak polimorfizma i prisutnost timina (T) na poziciji 606 (slika 16.). Razgradnjom PCR produkta *MnII* restrikcijskom endonukleazom, vizualizacija fragmenta duljine 236 bp označava polimorfizam i prisutnost gvanina (G) na poziciji 612, dok vizualizacija fragmenta duljine 303 bp označava izostanak polimorfizma i prisutnost adenina (A) na poziciji 612 (slika 17.).



Slika 16. Gel elektroforeza restrikcijske razgradnje PCR produkta MTNR1A gena ovaca s *RsaI* restrikcijskom endonukleazom i primjer dobivenih genotipova (CC, CT, TT). M – standard razmaka 100 baznih parova; 1 -12 – oznake uzoraka.



Slika 17. Gel elektroforeza restrikcijske razgradnje PCR produkta MTNR1A gena ovaca s *MnII* restrikcijskom endonukleazom i primjer dobivenih genotipova (GG, GA, AA). M – standard razmaka 50 baznih parova; 1 -12 – oznake uzoraka.

3.6. Određivanje slijeda nukleotida

S ciljem utvrđivanja preostalih polimorfizma na drugom egzonu MTNR1A gena provedeno je određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje) na 15 uzoraka svake istraživane pasmine. Sekvencirano je po pet uzoraka svakog genotipa (GG, GA i AA) utvrđenog s *MnII* restrikcijskom endonukleazom. S obzirom da u svih istraživanih pasmina nisu utvrđena sva tri genotipa *MnII* restrikcijskom endonukleazom u tablici 6. prikazan je broj uzoraka svakog genotipa istraživanih pasmina ovaca i muflona u kojih je određen slijed nukleotida.

Tablica 6. Broj sekvenciranih genotipova po pojedinoj istraživanoj pasmini

Pasmina	Broj genotipiziranih uzoraka	Sekvenciran broj uzoraka pojedinog genotipa		
		GG	GA	AA
Muflon	30	0	4	5
Bovška ovca	60	5	5	3
Cigaja	31	5	5	0
Dalmatinska pramenka	40	5	4	0
Dubrovačka ovca	32	5	5	0
Istarska ovca	30	5	5	1
Istočnofrizijska ovca	38	5	5	5
Lička pramenka	50	5	5	5
Paška ovca	61	5	5	4
Romanovska ovca	32	5	5	5
Suffolk	35	5	5	5
Σ	439	50	53	33

Za potrebe određivanja slijeda nukleotida na istraživanom dijelu MTNR1A gena provedeno je novo umnažanje ciljane DNK s istim začetnim oligonukleotidima kao što je prethodno opisano (vidi poglavlje 3.4). Lančana reakcija polimerazom (PCR) provedena je u ukupnom volumenu od 15 μ L uključujući:

- 5,1 μ L vode slobodne od nukleaza;
- 7,5 μ L GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix;
- 0,6 μ L začetnog oligonukleotida prema naprijed (engl. *forward*) 10 μ M;
- 0,6 μ L začetnog oligonukleotida prema natrag (engl. *reverse*) 10 μ M;
- 1,2 μ L tj. 30 ng genomske DNK.

Temperaturno-vremenski okvir na mastercycleru (Eppendorf) bio je identičan kao u poglavlju 3.4.

Kontrola uspješnosti amplifikacije PCR produkata vršena je na 1% gelu agaroze pomoću gel elektroforeze paralelno s standardom od 100 baznih parova. Nakon potvrde

uspješnosti amplifikacije ciljnog odsječka DNK uslijedilo je njegovo pročišćavanje prije stavljanja na 3130XL Genetic Analyzer.

U prvom koraku pročišćavanja volumenu PCR produkta od 5 μ l dodano je 1,2 μ l miksa 1 (tablica 7.). Nakon miješanja na tresilici i kratkog centrifugiranja na mikrocentrifugi uzorci su stavljeni na Thermal Cycler na sljedeći temperaturno-vremenski okvir:

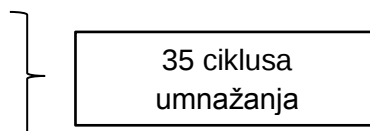
- 37°C 15 minuta
- 85°C 15 minuta
- 4°C ∞ .

Tablica 7. Korišteni miksevi za pročišćavanje sekvence DNK prije sekvenciranja

	Miks 1	Miks 2	Miks 3
Komponente pojedinog miksa	Exo 0,4 μ l	MQ voda 3,7 μ l	96% etanol 25 μ l
	FasAP 0,8 μ l	Byg Dye 0,8 μ l	Na acetat 1 μ l
		Začetni oligonukleotid prema naprijed 0,5 μ l	
Ukupni volumen miksa po uzorku	1,2 μ l	5 μ l	25 μ l

U sljedećem koraku PCR produktu je dodano 5 μ l miksa 2 (tablica 7.), kratko su promješani na tresilici, centrifugirani na mikrocentrifugi te stavljeni na Thermal Cycler na sljedeći temperaturno-vremenski okvir:

- 96°C 1 minuta
- 96°C 15 sekundi
- 50°C 10 sekundi
- 60°C 4 minute
- 4°C ∞ .



Po završetku umnažanja ciljne sekvence DNK, u tubice od 1,5 ml odpipetirano je 25 μ l miksa 3 i 5 μ l PCR produkta. Nakon kratkog miješanja na tresilici i centrifugiranja na mikrocentrifugi uzorci su ostavljeni u tami na sobnoj temperaturi 10 – 15 minuta. Zatim je uslijedilo centrifugiranje u trajanju od 20 minuta na 16 400 rpm. Nakon centrifugiranja odpipetiran je sav tekući sadržaj pazeći na pelet. Peletu je dodano 250 μ l 70% etanola te su uzorci centrifugirani na 16 400 rpm 5 minuta. Ponovno je otpipetiran sav tekući sadržaj i tubice su ostale otvorene na sobnoj temperaturi da ispare ostaci etanola kroz 10 minuta. Nakon sušenja pelet je otapan u 12 μ l Formamida kroz 30 minuta. Potom je napravljena denaturacija na termobloku na 95°C u trajanju od 3 minute, a zatim su uzorci ohlađeni na ledu. Nakon kratkog centrifugiranja uzorci su iz 1,5 ml tubica odpipetirani i stavljeni na ploču za sekvenciranje.

Određivanje slijeda nukleotida je provedeno samo iz smjera 5'→3' začetnog oligonukleotida na DNA sekvenceru 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) na Oddelku za Zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Dobiveni sljedovi nukleotida istraživanih jedinki prvo su vizualizirani programom Chromas LITE verzija 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd) sa svrhom utvrđivanja ispravnosti dobivenog nukleotidnog slijeda. Nakon toga dobiveni nukleotidni sljedovi su poravnati (engl. *alignen*) s referentnim slijedom nukleotida (GenBank Acc. No. U14109; prilog 2.) u programu MEGA 6.06. (Tamura i sur., 2013). Navedeno je omogućilo utvrđivanje nukleotidnih razlika između referentne sekvence (U14109) i sekvenci istraživanih pasmina ovaca i muflona.

3.7. Statistička obrada podataka

Brojanjem utvrđenih genotipova s *RsaI* i *MnII* restrikcijskim endonukleazama dobivene su frekvencije genotipova na pozicijama 606 i 612. Iz utvrđenih frekvencija genotipova izračunate su frekvencije pojedinih alela korištenjem statističkog programa R (R Core Team, 2008), zbirno za sve istraživane pasmine te pojedinačno po svakoj istraživanoj pasmini. Odstupanje utvrđenih genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže obavljeno je pomoću Chi-Square testa (χ^2) također R statističkim programom korištenjem paketa „genetics“. Razlike između istraživanih pasmina na temelju utvrđenih genotipova napravljene su statističkim programom R pomoću paketa „stats“ i funkcije „chisq.test“ pomoću Chi-Square testa (χ^2).

Statistička obrada podataka obavljena je primjenom procedura (MEANS, FREQ, TABULATE, SGPLOT, MIXED) unutar softverskog paketa SAS/STAT® ver. 9.4 (2013) i paketa unutar statističkog programa R (R Core Team, 2008). Grafički prikaz podataka napravljen je primjenom alata programa Microsoft Excel 2010.

Prije statističke obrade podaci su pročišćeni od nelogičnih vrijednosti. Tako je 10 vrijednosti za dob pri prvom janjenju tretirana kao nepostojeća vrijednost jer su vrijednosti izmjerenog svojstva bile veće od 900 dana. Također su iz analize izostavljene 4 vrijednosti za prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja s obzirom da su navedene vrijednosti bile veće od 600 dana. Nadalje, s obzirom da većinu pasmina obuhvaćenih predmetnim istraživanjem odlikuje plodnost od 100 do 200%, sve istraživane životinje na osnovu tipa rođenja podijeljene su u kategorije samci i blizanci. U kategoriju blizanaca pribrojeno je i 9 ovaca koje su rođene kao trojke (6 ovaca) i četvorke (3 ovce), jer su bile prisutne samo u istočnofrizijske i romanovske ovce te nisu svrstavane u posebnu kategoriju

Pri izračunu dobi pri prvom janjenju i dužine međujanjidbenog razdoblja automatskim izračunom pomoću programa Microsoft Excel 2010, a godina je činila razdoblje od 360 dana.

Za procjenu utjecaja genotipova na dob ovaca pri prvom janjenju korišten je slijedeći linearni model:

$$Y1_{ijklm} = \mu + tr_i + sr_j + p_k + G_l + e_{ijklm}, \text{ gdje je:}$$

$Y1_{ijklm}$ – m -ta opažena vrijednost dobi pri prvom janjenju,

μ – ukupna srednja vrijednost,

tr_i – tip rođenja (i =samac, blizanac),

sr_j – sezona rođenja (j =proljeće, ljeto, jesen, zima),

p_k – utjecaj pasmine (k =istraživane pasmine ovaca),

G_l – utjecaj genotipa na lokusu 606 (l =CC, CT, TT) ili utjecaj genotipa na lokusu 612 (l =GG, GA, AA),

e_{ijklm} – slučajna greška (neprotumačeni dio).

Za procjenu utjecaja genotipova na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja korišten je slijedeći linearni model:

$$Y2_{ijklmn} = \beta_0 + \beta_1 x_{ijklmn} + tr_i + sr_j + p_k + G_l + e_{ijklmn}, \text{ gdje je:}$$

$Y2_{ijklmn}$ – n -ta opažena vrijednost za prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja,

β_0 – vrijednost y kada je $x=0$ (engl. intercept),

β_1 – regresijski koeficijent linearne regresije,

x_{ijklmn} – dob pri prvom janjenju s prosjekom μ_x (kovarijabla),

tr_i – tip rođenja (i =samac, blizanac),

sr_j – sezona rođenja (j =proljeće, ljeto, jesen, zima),

p_k – utjecaj pasmine (k =istraživane pasmine ovaca),

G_l – utjecaj genotipa na lokusu 606 (l =CC, CT, TT) ili utjecaj genotipa na lokusu 612 (l =GG, GA, AA),

e_{ijklmn} – slučajna greška (neprotumačeni dio).

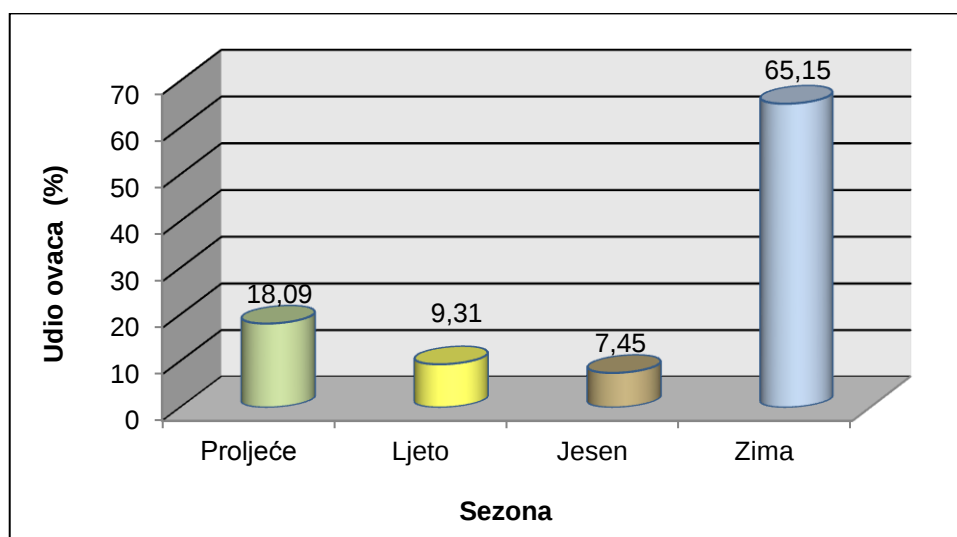
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Reprodukcijski pokazatelji istraživanih životinja

Prikupljeni reprodukcijski pokazatelji deset različitih pasmina ovaca obuhvaćenih predmetnim istraživanjem poslužili su za utvrđivanje sezone i tipa rođenja istraživanih jedinki te za izračunavanje sezone(a) njihovih janjenja.

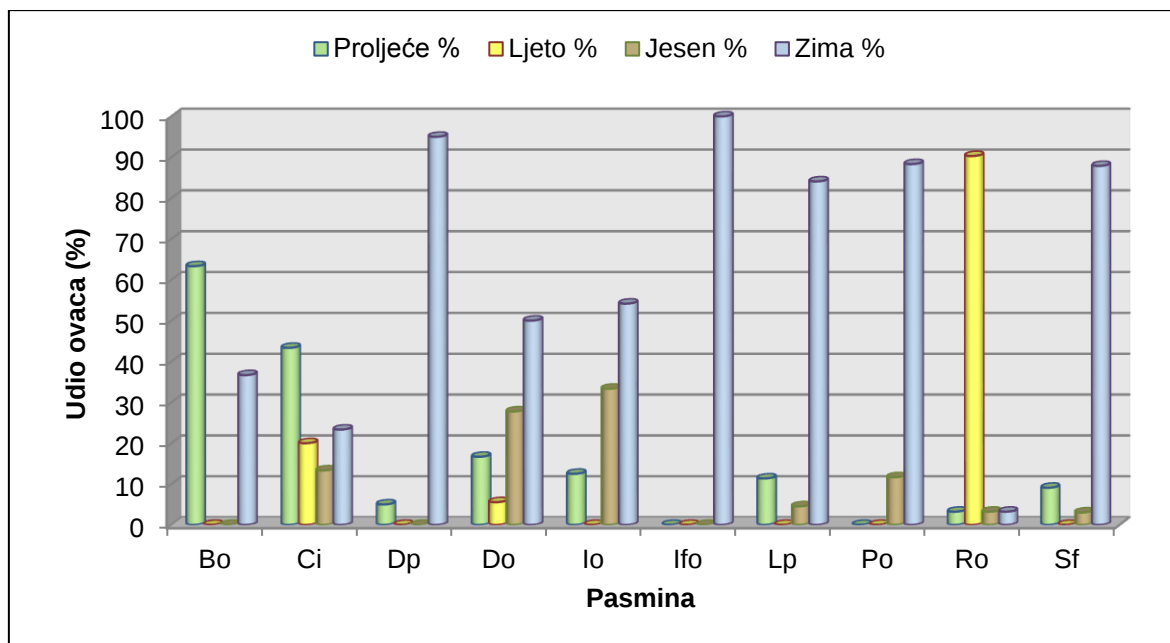
4.1.1. Sezona rođenja

Predmetnim istraživanjem ukupno je bilo obuhvaćeno 439 životinja, a za njih 376 bili su poznati datumi rođenja koji su poslužili za utvrđivanje sezone rođenja. S obzirom na sezonu rođenja, od 376 životinja, njih 245 je bilo rođeno zimi, 68 u proljeće, 35 ljeti, a 28 u jesen (tablica 8.). Prikazano relativnim vrijednostima, najviše rođenih životinja bilo je zimi (65,15%), zatim u proljeće (18,09%), ljeti (9,31%), dok je najmanje bilo rođenih životinja u jesen (7,45%, grafikon 1.).



Grafikon 1. Udio ovaca rođenih po sezonama

Iz tablice 8. vidljivo je da su ovisno o pasmini istraživane pasmine ovaca rođene u različitim sezonama. Tijekom sve četiri sezone rođene su jedinke pasmine cigaja, dubrovačka ovca i romanovska ovca, dok su u tri sezone (proljeće, jesen i zimu) rođene jedinke pasmine istarska ovca, lička pramenka i Suffolk. U dvije sezone, proljeće i zimu rođene su jedinke pasmine bovška ovca i dalmatinska pramenka, te u jesen i zimu jedinke paške ovce. Jedinke istočnofrizijske ovce rođene su samo tijekom zimske sezone (grafikon 2.).



Grafikon 2. Udio ovaca rođenih po sezonama s obzirom na pasminu

U proljeće je rođen najveći broj jedinki bovške ovce (38 ovaca) i cigaje (13 ovaca), dok niti jedna jedinka istočnofrizijske i paške ovce nije rođena tijekom proljeća. Jedinke u samo tri pasmine bile su rođene ljeti i to: 28 jedinki romanovske ovce, šest jedinki cigaje i jedna jedinka dubrovačke ovce. Po broju rođenih jedinki u jesenskom razdoblju dominiraju istarska ovca, paška ovca, dubrovačka ovca i cigaja s osam, sedam, pet i četiri rođene jedinke, zatim lička pramenka (dvije jedinke) te romanovska ovca i Suffolk (jedna jedinka). Tijekom zime rođeno je najviše istraživanih ovaca, od toga 53 paške ovce, 38 dalmatinskih pramenki, 37 ličkih pramenki, 36 istočnofrizijskih ovaca, 29 Suffolka, 22 bovške ovce, 13 istarskih ovaca, devet dubrovačkih ovaca, sedam cigaja i jedna romanovska ovca (tablica 8.).

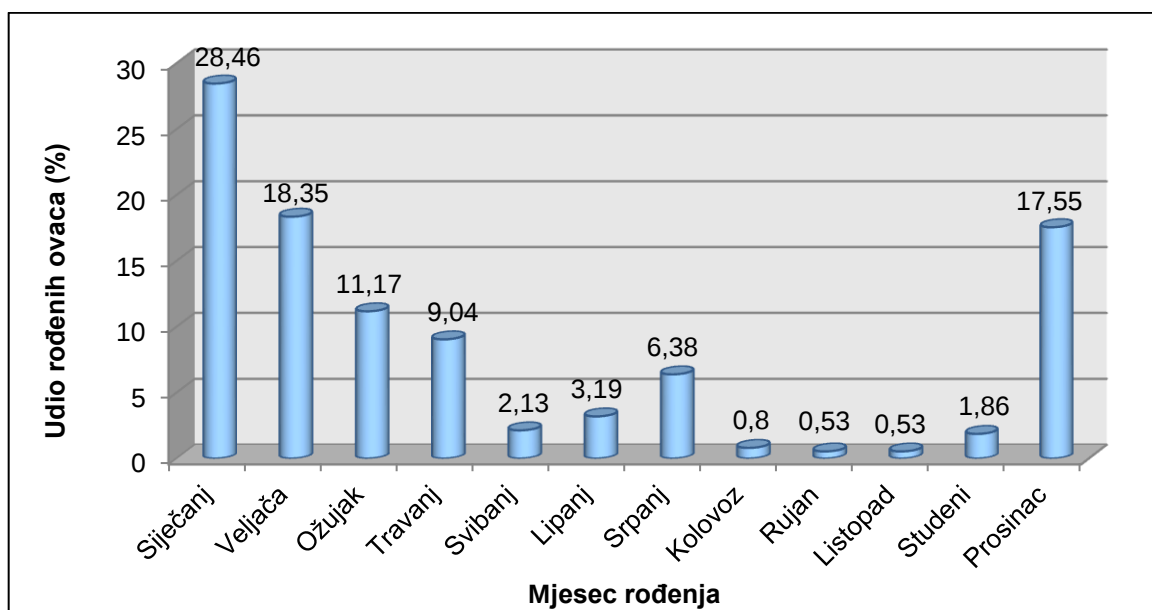
S obzirom na pasminu, distribucija rođenja istih po sezonama uvelike se razlikovala. Većina jedinki bovške ovce i cigaje iz istraživanja rođena je u proljeće (63,33%, 43,34%), romanovske ovce u ljeto (90,31%), dok su jedinke ostalih istraživanih pasmina u najvećoj mjeri rođene tijekom zime. Po broju ovaca rođenih zimi dominirale su istočnofrizijske ovce (100%), dalmatinska pramenka (95%), paška ovca i Suffolk (obje s 88%), lička pramenka (84%), istarska ovca (54%) i dubrovačka ovca (50%).

Tablica 8. Broj i udio ovaca rođenih po sezonama s obzirom na pasminu

Pasmina	N	Sezona rođenja							
		Proljeće		Ljeto		Jesen		Zima	
		n	%	n	%	n	%	N	%
Bovška ovca	60	38	63,33	0	0,00	0	0,00	22	36,67
Cigaja	30	13	43,34	6	20,00	4	13,33	7	23,33
Dalmatinska pramenka	40	2	5,00	0	0,00	0	0,00	38	95,00
Dubrovačka ovca	18	3	16,67	1	5,56	5	27,77	9	50,00
Istarska ovca	24	3	12,50	0	0,00	8	33,33	13	54,17
Istočnofrizijska ovca	36	0	0,00	0	0,00	0	0,00	36	100,0
Lička pramenka	44	5	11,36	0	0,00	2	4,55	37	84,09
Paška ovca	60	0	0,00	0	0,00	7	11,67	53	88,33
Romanovska ovca	31	1	3,23	28	90,31	1	3,23	1	3,23
Suffolk	33	3	9,09	0	0,00	1	3,03	29	87,88
Σ	376	68	18,09	35	9,31	28	7,45	245	65,15

N – ukupan broj životinja po pasmini; n – broj rođenih životinja po sezoni; % - udio rođenih životinja po sezoni.

Promatrajući broj i udio rođenih životinja po mjesecima tijekom godine najviše je životinja rođeno u siječnju (107 životinja), a najmanje u rujnu i listopadu (dvije životinje; tablica 9., grafikon 3.).



Grafikon 3. Udio ovaca rođenih po mjesecima

Po broju rođenih životinja najfrekventniji mjeseci bili su siječanj, veljača, prosinac i ožujak, unutar kojih je bilo rođeno 75,53% istraživanih životinja. U preostalim mjesecima tijekom godine rođene su 92 životinje ili njih 24,47%. Iz navedenog treba naglasiti travanj i svibanj, kada je rođeno 9,04% i 6,38% istraživanih životinja, dok je udio rođenih životinja u ostalim mjesecima bio manji od 3,5% (tablica 9.).

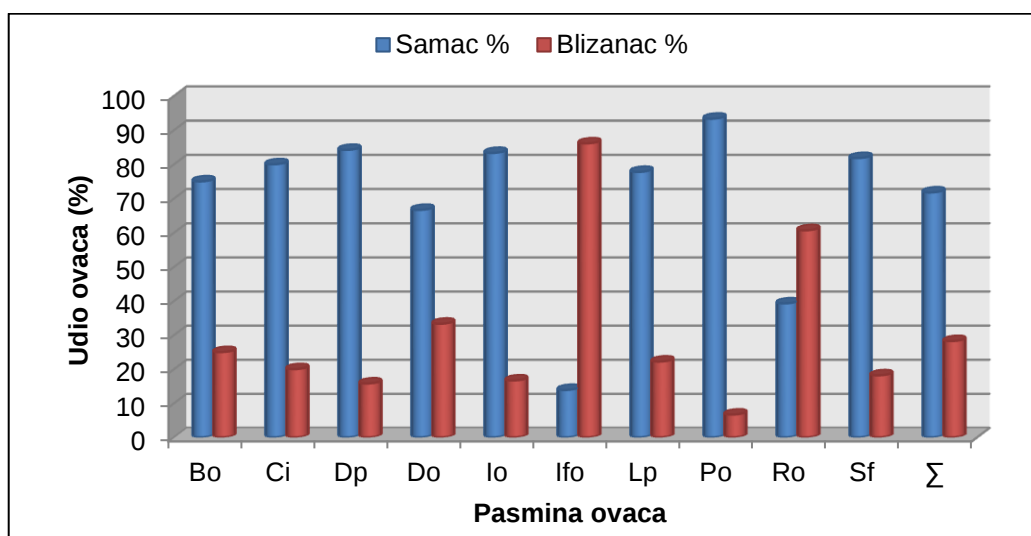
Tablica 9. Broj i udio istraživanih ovaca rođenih u pojedinim mjesecima od 2001. do 2013. godine

Mjesec rođenja	n	udio (%)
Siječanj	107	28,46
Veljača	69	18,35
Ožujak	42	11,17
Travanj	34	9,04
Svibanj	8	2,13
Lipanj	12	3,19
Srpanj	24	6,38
Kolovoz	3	0,80
Rujan	2	0,53
Listopad	2	0,53
Studen	7	1,86
Prosinac	66	17,55
Σ	376	100,00

n – broj životinja rođen u pojedinom mjesecu tijekom godine; % - udio životinja rođenih u pojedinom mjesecu tijekom godine.

4.1.2. Tip rođenja

S obzirom na tip rođenja sve istraživane jedinice svrstane su u dvije kategorije: rođene kao samci ili kao blizanci (grafikon 4. i tablica 10.).



Grafikon 4. Udio ovaca rođenih kao samac i kao blizanac

Većina istraživanih ovaca rođena je kao jedno janje u leglu te je udio ovaca rođenih kao samci bio 71,77%, dok je bilo 28,23% istraživanih jedinki rođeno kao blizanci (tablica 10.).

Tablica 10. Tip rođenja istraživanih ovaca s obzirom na pasminu

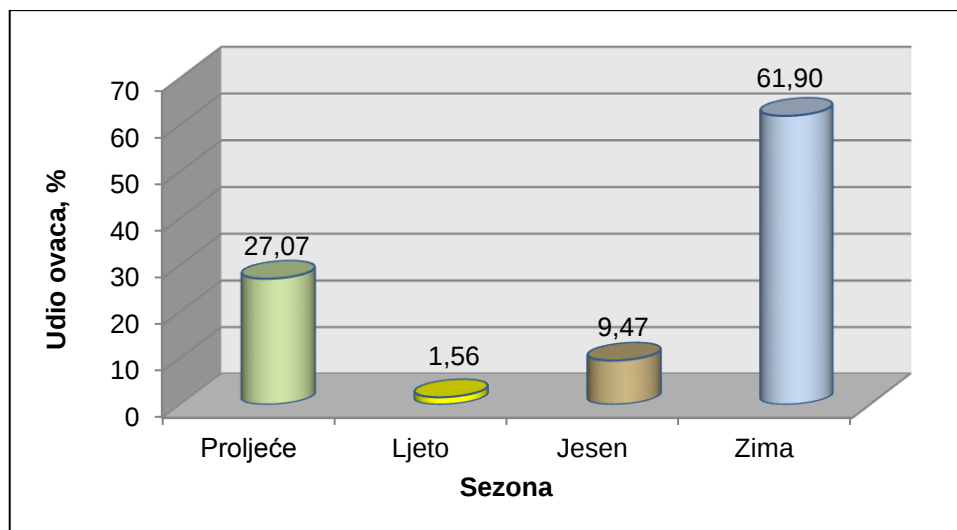
Pasmina	N	Tip rođenja			
		Samac		Blizanac	
		n	%	n	%
Bovška ovca	60	45	75,00	15	25,00
Cigaja	30	24	80,00	6	20,00
Dalmatinska pramenka	38	32	84,21	6	15,79
Dubrovačka ovca	18	12	66,67	6	33,33
Istarska ovca	24	20	83,33	4	16,67
Istočnofrizijska ovca	36	5	13,89	31	86,11
Lička pramenka	45	35	77,78	10	22,22
Paška ovca	60	56	93,33	4	6,67
Romanovska	28	11	39,29	17	60,71
Suffolk	33	27	81,82	6	18,18
Σ	372	267	71,77	105	28,23

N – ukupan broj životinja po pasmini; n – broj životinja s obzirom na tip rođenja; % – udio životinja s obzirom na tip rođenja.

Budući da je većina pasmina obuhvaćenih predmetnim istraživanjem bila u tipu pramenke, najveći broj istraživanih jedinki rođen je kao jedino janje u leglu (tablica 10.). Najveći broj ovaca rođenih kao samac utvrđen je u paške ovce (93,33%), a najmanji u istočnofrizijske ovce (13,89%), dok je najveći udio ovaca rođenih kao blizanac utvrđen u istočnofrizijske ovce te u romanovske ovce (86,11%; 60,71%). Najmanje istraživanih jedinki rođenih kao blizanci utvrđen je u paške ovce (6,67%), dok je najviše istraživanih jedinki rođenih bližnjem u sezonski poliestričnih pasmina bilo u dubrovačke ovce (33,33%), bovške ovce (25,00%) i ličke pramenke (22,22%).

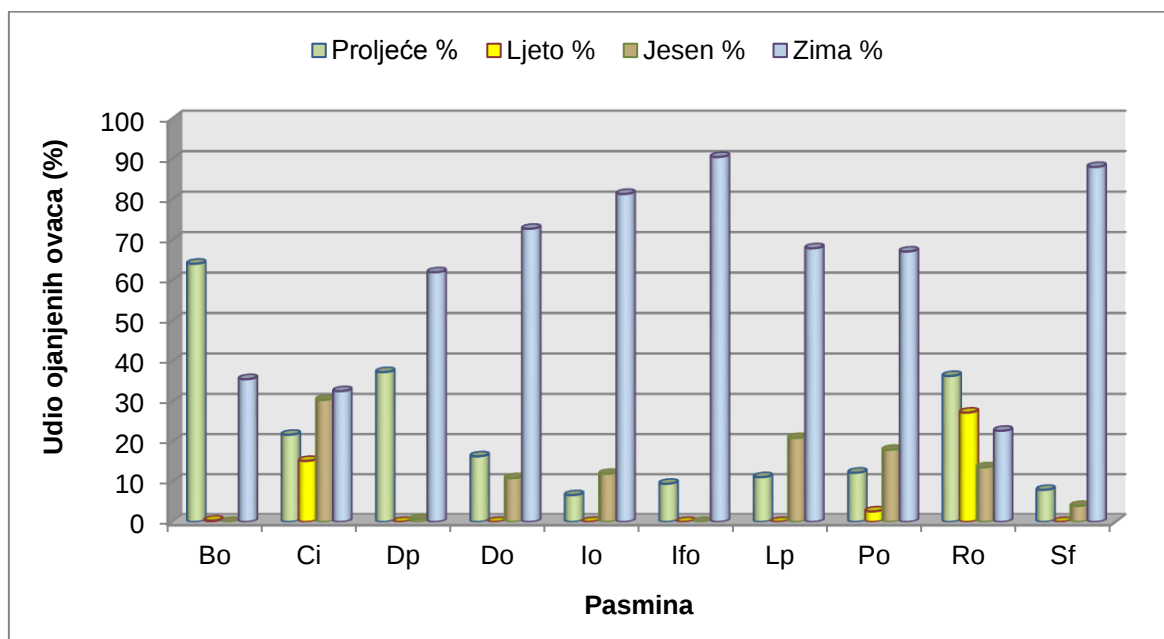
4.1.3. Sezona janjenja

Od 10 pasmina ovaca u ovom istraživanju prikupljeni su podaci za ukupno 1 278 janjenja svrstanih u četiri istraživane sezone. Najveći postotak janjenja evidentiran je tijekom zime (791 janjenje ili 61,90%), a najmanji tijekom ljeta (20 janjenja; 1,56%) kao što je vidljivo u tablici 11. Po broju evidentiranih janjenja slijedi proljeće s 346 janjenja (27,07%) i jesen s 121 janjenjem (9,47%; grafikon 5.).



Grafikon 5. Udio janjenja ovaca po sezonama

U romanovske ovce kao tipične poliestrične pasmine te cigaje utvrđena su janjenja tijekom svih istraživanih sezona u rasponu od 14% do 36% (tablica 11.). Paška ovca također se janjila tijekom cijele godine, no glavnina janjenja (67,11%) bila je u zimskom razdoblju. Nasuprot navedenom, u dalmatinske pramenke, dubrovačke ovce, istarske ovce, istočnofrizijske ovce, ličke pramenke i Suffolka nisu utvrđena janjenja u ljetnom razdoblju, te u bovške i istočnofrizijske ovce tijekom jeseni. U dubrovačke ovce, istarske ovce i ličke pramenke utvrđeno je 10,91%, 12,00% i 20,93% janjenja u jesen što upućuje na pojavu estrusa tijekom ljeta, odnosno nekoliko mjeseci ranije u odnosu na uobičajenu sezonu.



Grafikon 6. Udio janjenja ovaca po sezonama s obzirom na pasminu

Tablica 11. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na pasminu

Pasmina	N	Sezona							
		Proljeće		Ljeto		Jesen		Zima	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Bovška ovca	298	191	64,09	1	0,34	0	0,00	106	35,57
Cigaja	46	10	21,74	7	15,22	14	30,43	15	32,61
Dalmatinska pramenka	142	53	37,32	0	0,00	1	0,70	88	61,98
Dubrovačka ovca	55	9	16,36	0	0,00	6	10,91	40	72,73
Istarska ovca	75	5	6,67	0	0,00	9	12,00	61	81,33
Istočnofrizijska ovca	147	14	9,52	0	0,00	0	0,00	133	90,48
Lička pramenka	215	24	11,16	0	0,00	45	20,93	146	67,91
Paška ovca	228	28	12,28	6	2,63	41	17,98	153	67,11
Romanovska ovca	22	8	36,36	6	27,27	3	13,64	5	22,73
Suffolk	50	4	8,00	0	0,00	2	4,00	44	88,00
Σ	1278	346	27,07	20	1,56	121	9,47	791	61,90

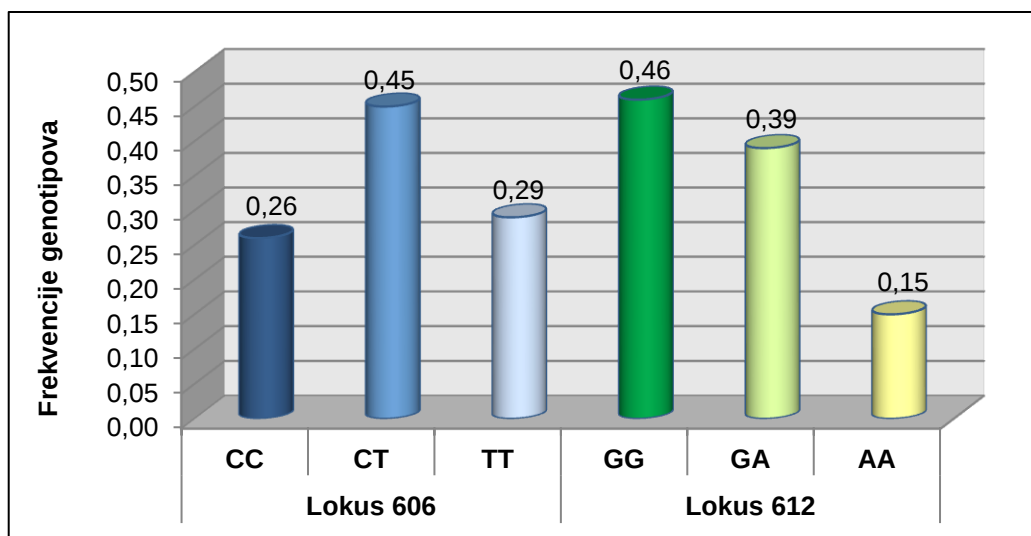
N – ukupan broj janjenja po pasmini; n – broj janjenja po sezoni; % – udio janjenja po sezoni.

Usporedbom rezultata u tablici 8. i tablici 11. u većine istraživanih pasmina vidljiva je vrlo velika sličnost između sezona u kojima su istraživane jedinice rođene te sezona u kojima su evidentirana njihova janjenja. U bovške ovce većina istraživanih jedinki je rođena u proljeće (63,33%), a u istoj sezoni je evidentirana i većina janjenja (64,09%). U Suffolka je zimi rođeno 87,88% istraživanih jedinki, a u istoj sezoni je evidentirano i 88% janjenja. Nešto veći nesrazmjer sezone rođenja majke i sezone janjenja pojedine pasmine evidentirano je u ovaca dalmatinske pramenke (95% i 62%), dubrovačke rude (50% i 73%), istarske ovce (54% i 81%), ličke pramenke (84% i 68%) i paške ovce (88% i 67%). Međutim, u cigaje i romanovske ovce u kojih su jedinice rođene u svim istraživanim sezonama, evidentirana su i janjenja tijekom svih sezona samo su njihovi omjeri između sezona nešto različiti. Npr. u romanovske ovce većina jedinki rođena je ljeti (90%), dok je distribucija evidentiranih janjenja po istraživanim sezonama bila podjednaka s naglaskom na proljeće (36,36%) i ljeto (27,27%).

4.2. Frekvencije alela i genotipova MTNR1A gena

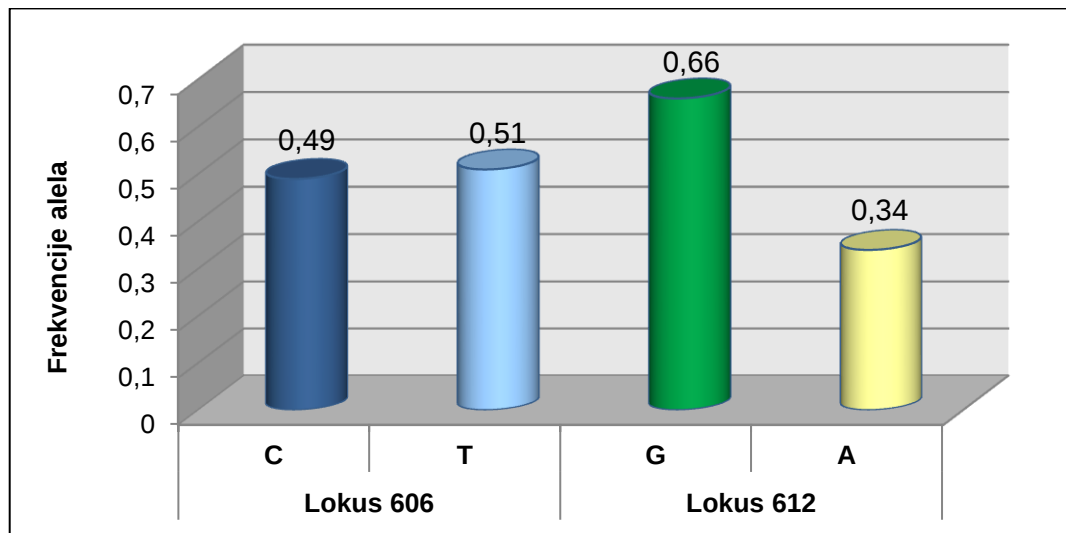
Razgradnjom PCR produkata drugog egzona MTNR1A gena duljine 824 parova baza s *RsaI* i *MnII* restrikcijskim endonukleazama utvrđeno je postojanje sva tri genotipa na lokusima 606 i 612 (grafikon 7.). Od ukupno 439 genotipiziranih uzoraka na lokusu 606 utvrđeno je najviše heterozigota (CT; 45,10%), zatim homozigota TT (28,70%) te homozigota CC (26,20%), dok je na lokusu 612 utvrđeno najviše homozigota GG

(46,47%), zatim heterozigota (GA; 38,95%), dok je bilo najmanje utvrđenih homozigota AA (14,58%).



Grafikon 7. Distribucija genotipova na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena

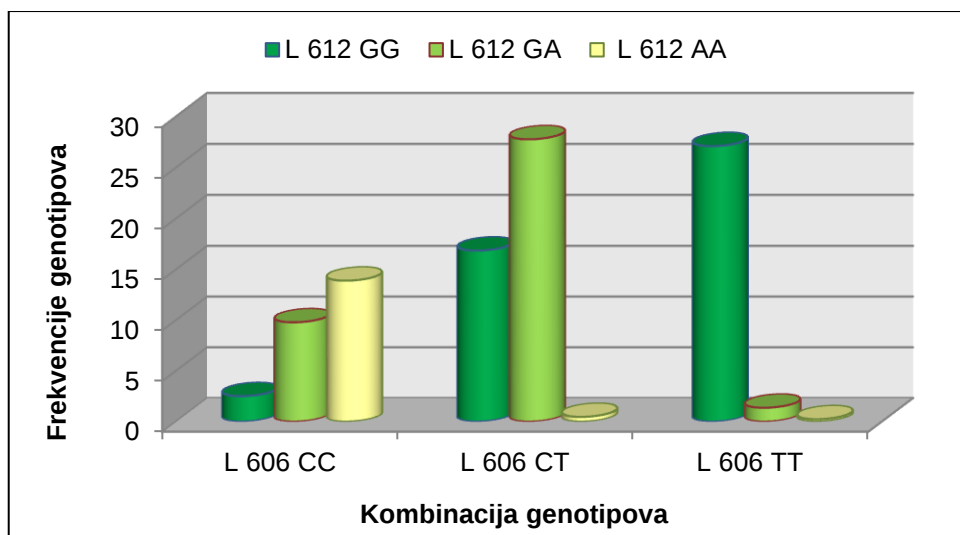
Iz utvrđenog broja genotipova na lokusima 606 i 612 drugog egzona MTNR1A gena izračunate su frekvencije alela (grafikon 8.). Na lokusu 606 utvrđene su podjednake frekvencije C i T alela (0,49 i 0,51), dok su na lokusu 612 utvrđene veće frekvencije G u odnosu na A alel (0,66 i 0,34).



Grafikon 8. Frekvencije alela na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena

Genotipizacija istraživanih jedinki na oba lokusa omogućila je utvrđivanje kombinacije polimorfizama na pozicijama 606 i 612 sekvence drugog egzona MTNR1A gena (grafikon 9.). Najzastupljenije su bile kombinacije heterozigotnih genotipova s

27,78% na lokusima CT606 i GA612, odnosno prisudstvo homozigota TT na lokusu 606 i homozigota GG na lokusu 612 (TT606 i GG612, 27,11%). Niže frekvencije genotipova od 16,86% utvrđene su za kombinacije CT606/GG612, odnosno 13,90% za kombinaciju CC606/AA612. Kombinacije genotipova koje su bile zastupljene s najmanjim udjelom su kombinacije homozigota TT i AA (TT606 i AA612; 0,23%) te kada je na lokusu 606 bio prisutan heterozigot, a na lokusu 612 homozigot AA (CT606 i AA612, 0,46%; grafikon 9. i tablica 12.).



Grafikon 9. Frekvencija pojedinih kombinacija genotipova s obzirom na lokus 606 i lokus 612 MTNR1A gena

U tablici 12. dat je pojedinačni i zbirni prikaz broja i udjela kombinacija genotipova na lokusima 606 i 612 MTNR1A gena za 439 istraživanih jedinki.

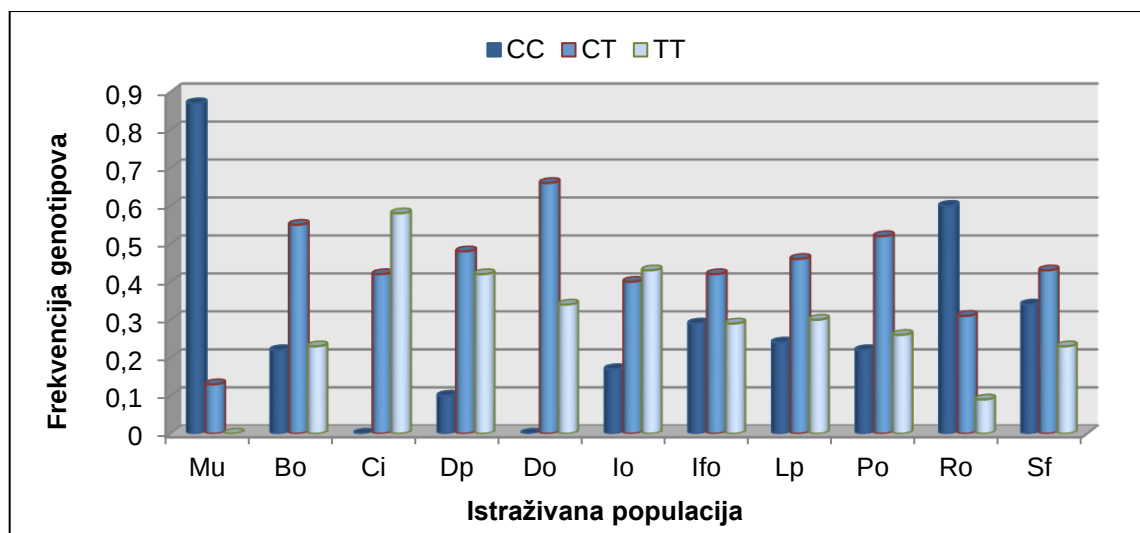
Tablica 12. Pojedinačni i zbirni prikaz broja i udjela kombinacija genotipova na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena ovaca

L 606	L 612						Σ P606	
	GG		GA		AA			
	n	%	n	%	n	%	n	%
CC	11	2,51	43	9,79	61	13,90	115	26,20
CT	74	16,86	122	27,78	2	0,46	198	45,10
TT	119	27,11	6	1,36	1	0,23	126	28,70
Σ P612	204	46,48	171	38,93	64	14,59	439	100,00

n – broj genotipova; udio pojedinog genotipa.

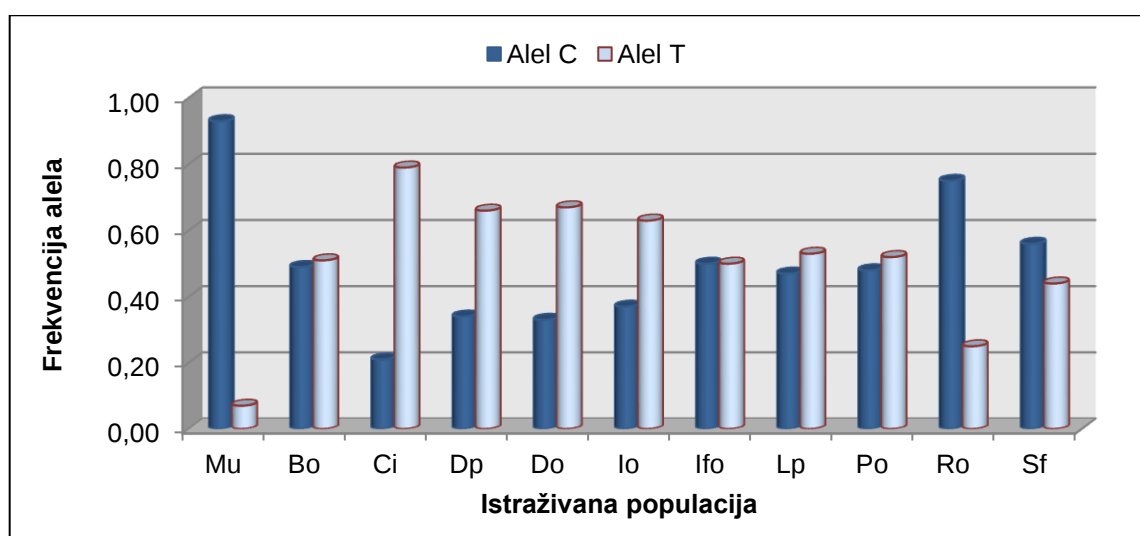
U tablici 13. dana je distribucija broja utvrđenih genotipova s frekvencijama na poziciji 606 drugog egzona MTNR1A gena po pasminama. Najučestaliji genotip MTNR1A gena na lokusu 606 u osam pasmina (bovška ovca, dalmatinska pramenka, dubrovačka

ovca, istočnofrizijska ovca, lička pramenka, paška ovca i Suffolk) bio je CT genotip s frekvencijama u rasponu od 0,42 do 0,66. Suprotno, samo su u muflona i romanovske ovce utvrđene frekvencije genotipa CC s vrijednostima od 0,87 i 0,60. Najveće vrijednosti homozigotnog genotipa TT evidentirane su u populaciji cigaje i istarske ovce s frekvencijama od 0,58 i 0,43. Interesantno, homozigotni genotipovi CC i TT nisu utvrđeni u pojedinim populacijama. Tako genotip CC nije utvrđen u populaciji cigaje i dubrovačke ovce, odnosno TT genotip u populaciji muflona (grafikon 10. i tablica 13.).



Grafikon 10. Frekvencije genotipova na lokusu 606 MTNR1A gena istraživanih populacija

U 73% slučajeva utvrđene su veće frekvencije alela C u odnosu na alel T na lokusu 606 MTNR1A gena (tablica 13. i grafikon 11.).



Grafikon 11. Frekvencije alela na lokusu 606 MTNR1A gena istraživanih populacija

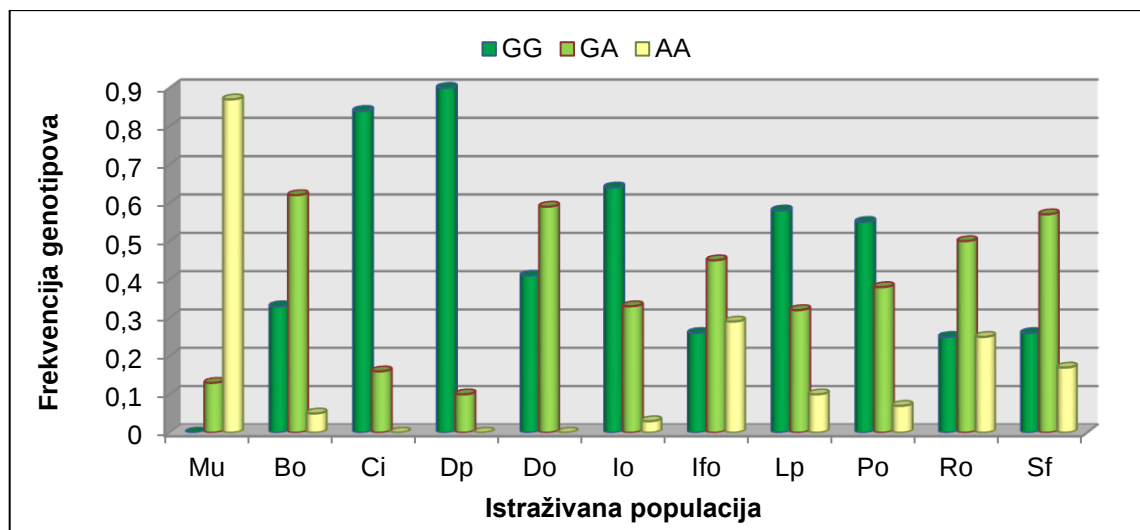
Najveća frekvencija alela T od 0,79 utvrđena je u populaciji cigaje, dok je u populacijama istarske ovce, dalmatinske pramenke i dubrovačke ovce frekvencija bila u rasponu od 0,63 do 0,67. Suprotno, alel C je bio najzastupljeniji u 26 jedinki muflona s frekvencijom od visokih 0,93, zatim u 10 jedinki romanovske i 15 jedinki Suffolk pasmine s značajno manjim frekvencijama od 0,75 i 0,56. Identična frekvencija oba alela utvrđena je u istočnofrizijske ovce (0,5 i 0,5), dok su podjednake frekvencije alela na lokusu 606 utvrđene u bovške ovce (0,49 i 0,51), ličke pramenke (0,47 i 0,53) i paške ovce (0,48 i 0,52).

Tablica 13. Utvrđene frekvencije alela i genotipova MTNR1A gena na lokusu 606

Pasmina	N	Lokus 606							
		Broj genotipova			Frekvencija genotipova			Frekvencija alela	
		CC	CT	TT	CC	CT	TT	C	T
Muflon	30	26	4	0	0,87	0,13	0,00	0,93	0,07
Bovška ovca	60	13	33	14	0,22	0,55	0,23	0,49	0,51
Cigaja	31	0	13	18	0,00	0,42	0,58	0,21	0,79
Dalmatinska pramenka	40	4	19	17	0,10	0,48	0,42	0,34	0,66
Dubrovačka ovca	32	0	21	11	0,00	0,66	0,34	0,33	0,67
Istarska ovca	30	5	12	13	0,17	0,40	0,43	0,37	0,63
Istočnofrizijska ovca	38	11	16	11	0,29	0,42	0,29	0,50	0,50
Lička pramenka	50	12	23	15	0,24	0,46	0,30	0,47	0,53
Paška ovca	61	13	32	16	0,22	0,52	0,26	0,48	0,52
Romanovska ovca	32	19	10	3	0,60	0,31	0,09	0,75	0,25
Suffolk	35	12	15	8	0,34	0,43	0,23	0,56	0,44
UKUPNO	439	115	198	126	0,26	0,45	0,29	0,49	0,51

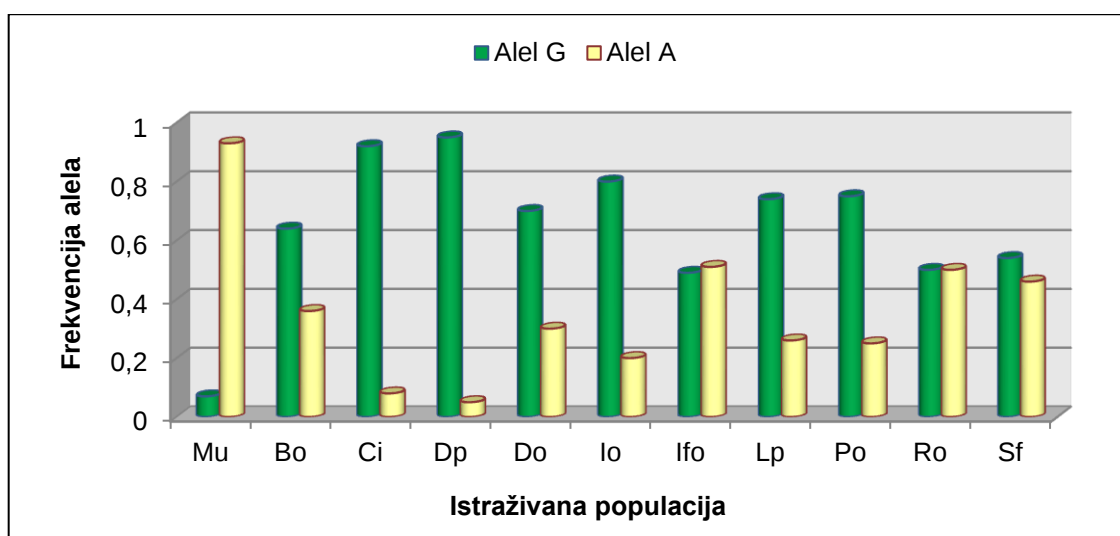
N – broj životinja.

Utvrđen broj i frekvencije genotipova te izračunate frekvencije alela na poziciji 612 MTNR1A gena prikazane su u grafikonu 12. i tablici 14.



Grafikon 12. Frekvencija genotipova na lokusu 612 MTNR1A gena istraživanih populacija

Između muflona i istraživanih pasmina ovaca frekvencije genotipova na lokusu 612 bile su vrlo različite. U muflona su utvrđene visoke frekvencije AA genotipa (0,87; grafikon 12.), dok genotip GG nije utvrđen, što je rezultiralo visokim frekvencijama alela A (0,93; grafikon 13.). Za razliku od muflona, distribucija frekvencija genotipova GG i GA bila je ravnomjerna između deset istraživanih pasmina. Tako je najmanja frekvencija GG genotipa od 0,55 utvrđena u paške ovce, a najveća od 0,90 u dalmatinske pramenke. Suprotno, frekvencije GA genotipa bile su ujednačenije s rasponom od 0,45 u istočnofrizijske ovce do 0,62 u bovške ovce. Interesantno, genotip AA nije utvrđen u tri istraživane pasmine (cigaje, dalmatinske pramenke i dubrovačke ovce; grafikon 12.) što je i razlogom prosječne niske frekvencije alela A u navedenih pasmina (grafikon 13.).



Grafikon 13. Frekvencije alela na lokusu 612 MTNR1A gena istraživanih populacija

Alel G utvrđen je u 80% istraživanih populacija ovaca s rasponom od 0,54 u Suffolk populaciji do 0,95 u populaciji dalmatinske pramenke. Frekvencija alela A neznatno je bila veća u istočnofrizijske ovce (0,51) u odnosu na alel G (0,49). Jedino je u romanovske ovce utvrđena identična frekvencija oba alela na lokusu 612 MTNR1A gena (0,50 i 0,50).

Tablica 14. Utvrđene frekvencije alela i genotipova MTNR1A gena na lokusu 612

Pasmina	N	Lokus 612							
		Broj genotipova			Frekvencija genotipova			Frekvencija alela	
		GG	GA	AA	GG	GA	AA	G	A
Muflon	30	0	4	26	0,00	0,13	0,87	0,07	0,93
Bovška ovca	60	20	37	3	0,33	0,62	0,05	0,64	0,36
Cigaja	31	26	5	0	0,84	0,16	0,00	0,92	0,08
Dalmatinska pramenka	40	36	4	0	0,90	0,10	0,00	0,95	0,05
Dubrovačka ovca	32	13	19	0	0,41	0,59	0,00	0,70	0,30
Istarska ovca	30	19	10	1	0,64	0,33	0,03	0,80	0,20
Istočnofrizijska ovca	38	10	17	11	0,26	0,45	0,29	0,49	0,51
Lička pramenka	50	29	16	5	0,58	0,32	0,10	0,74	0,26
Paška ovca	61	34	23	4	0,55	0,38	0,07	0,75	0,25
Romanovska ovca	32	8	16	8	0,25	0,50	0,25	0,50	0,50
Suffolk	35	9	20	6	0,26	0,57	0,17	0,54	0,46
Σ	439	204	171	64	0,46	0,39	0,15	0,66	0,34

N – broj životinja.

Testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže utvrđenih genotipova muflona i istraživanih pasmina ovaca na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena prikazano je u tablici 15.

Tablica 15. Testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže genotipova muflona i deset populacija ovaca na lokusima 606 i 612 MTNR1A gena

Pasmina	Lokus 606		Lokus 612	
	χ^2	P vrijednost	χ^2	P vrijednost
Muflon	0,153	1,000	0,153	1,000
Bovška ovca	0,604	0,441	6,976	0,004**
Cigaja	2,182	0,076	0,239	1,000
Dalmatinska pramenka	0,155	0,728	0,111	1,000
Dubrovačka ovca	7,632	0,003**	5,705	0,007**
Istarska ovca	0,578	0,704	0,052	1,000
Istočnofrizijska ovca	0,947	0,522	0,416	0,510
Lička pramenka	0,294	0,561	1,418	0,286
Paška ovca	0,163	0,798	0,002	1,000
Romanovska ovca	0,889	0,643	0,000	1,000
Suffolk	0,605	0,479	0,801	0,494

**P<0,01.

Rezultati χ^2 -testa pokazuju da dobiveni genotipovi MTNR1A gena u većini istraživanih populacija na oba istraživana lokusa MTNR1A gena statistički ne odstupaju značajno od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Statistički značajno odstupanje utvrđenih genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže utvrđeno je samo u tri slučaja, na lokusu 612 u bovške ovce ($P < 0,01$) te na oba lokusa (606 i 612) u dubrovačke ovce ($P < 0,01$).

Razlike između muflona i deset pasmina ovaca na temelju utvrđenih genotipova lokusa 606 prikazane su u tablici 16. Statistički značajne razlike u broju utvrđenih genotipova na lokusu 606 MTNR1A gena utvrđene su između muflona i svih istraživanih pasmina ovaca ($P < 0,05$; $P < 0,001$) te romanovske ovce i preostalih istraživanih pasmina ovaca ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$). Osim navedenih razlika, genotipovi populacija dubrovačke ovce i cigaje odstupali su od genotipova 8, odnosno 7 proučavanih populacija s različitim stupnjem značajnosti. Preciznije, statistički značajne razlike distribucije genotipova na lokusu 606 nije bilo između cigaje i slijedećih populacija: dalmatinske pramenke, dubrovačke i istarske ovce, odnosno dubrovačke ovce i populacija cigaje i dalmatinske pramenke. Općenito gledajući, distribucija genotipova na lokusu 606 bila je vrlo slična između većine preostalih pasmina ovaca. Tako su frekvencije genotipova dalmatinske pramenke i istarske ovce blizu frekvencijama genotipova ostalih sedam populacija ($P > 0,05$), odnosno, frekvencija genotipa dalmatinske pramenke značajno odstupa od onih u muflona i romanovske ovce ($P < 0,001$) te suffolk pasmine ($P < 0,05$), a frekvencija genotipa istarske ovce osim u muflona i romanovske ovce ($P < 0,001$), značajno odstupa s distribucijom genotipa dubrovačke ovce ($P < 0,05$). Preostale populacije ovaca: bovška ovca, istočnofrizijska ovca, lička pramenka, paška ovca i suffolk distribucijom utvrđenih genotipova međusobno statistički ne odstupaju jedne od drugih ($P > 0,05$).

Tablica 16. Razlike između utvrđenih genotipova na lokusu 606 između muflona i deset pasmina ovaca

Pasmina	Muflon	Bovška ovca	Cigaja	Dalmatinska pramenka	Dubrovačka ovca	Istarska ovca	Istočnofrizijska ovca	Lička pramenka	Paška ovca	Romanovska ovca	Suffolk
Muflon		34,946	48,761	42,352	48,546	31,226	23,667	30,430	35,693	6,603	19,256
Bovška ovca	***		14,418	5,025	8,271	3,817	1,565	0,959	0,140	13,251	8,271
Cigaja	***	***		4,078	3,557	5,832	12,418	11,211	12,709	30,097	15,805
Dalmatinska pramenka	***	NZ	NZ		4,553	0,813	4,761	3,437	3,911	21,755	7,410
Dubrovačka ovca	***	*	NZ	NZ		7,565	11,244	9,198	7,938	27,475	13,366
Istarska ovca	***	NZ	NZ	NZ	*		2,076	1,581	2,711	14,549	4,045
Istočnofrizijska ovca	***	NZ	**	NZ	**	NZ		0,284	1,144	7,631	0,427
Lička pramenka	***	NZ	**	NZ	**	NZ	NZ		0,459	11,295	1,205
Paška ovca	***	NZ	**	NZ	*	NZ	NZ	NZ		13,847	1,958
Romanovska ovca	*	***	***	***	***	***	*	**	***		4,729
Suffolk	***	NZ	***	*	***	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	

Iznad dijagonale nalaze se vrijednosti hi^2 testa, a ispod dijagonale naznačene su razine značajnosti na osnovu p vrijednosti: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NZ – nije značajno

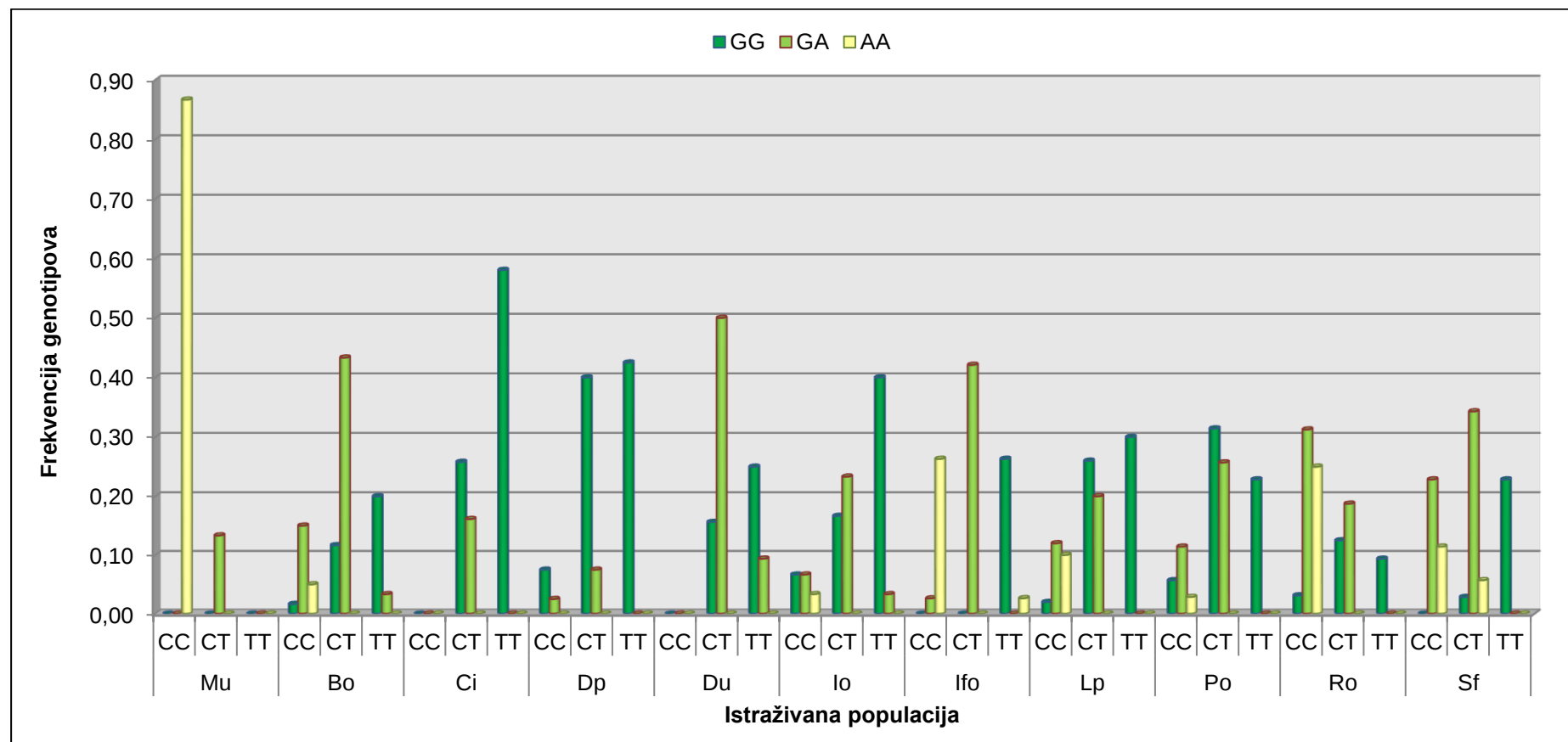
S obzirom na utvrđene genotipove na lokusu 612 MTNR1A gena muflon i istraživane pasmine ovaca međusobno su značajno različite, u čak 78% slučajeva (tablica 17.). U odnosu na lokus 606, na lokusu 612 između 11 istraživanih populacija utvrđen je duplo veći broj statistički značajnih razlika (25 u odnosu na 12). Tako su utvrđene statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između muflona i svih deset istraživanih pasmina ovaca ($P < 0,001$). Značajna odstupanja frekvencije genotipova utvrđena su u romanovske ovce i dalmatinske pramenke od preostalih devet pasmina ovaca ($P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$) izuzev istočnofrizijske ovce u prvom slučaju, odnosno cigaje u drugom slučaju. Populacije bovške ovce, cigaje, istočnofrizijske ovce i ličke pramenke na osnovu broja genotipova na lokusu 612 MTNR1A gena statistički značajne razlike ne pokazuju s još dvije populacije u istraživanju. Tako npr. nisu utvrđene značajne razlike između distribucije genotipova bovške ovce s dubrovačkom ovcom i Suffolkom, cigaje s dalmatinskom pramenkom i istarskom ovcom, istočnofrizijske ovce s romanovskom i Suffolkom i ličke pramenke s paškom i istarskom ovcom. Sličnost distribucije genotipova lokusa 612 dubrovačka ovca, paška ovca i Suffolk pokazivale su s još tri populacije iz predmetnog istraživanja. Točnije, dubrovačka ovca s cigajom, istarskom i paškom ovcom; paška ovca s ličkom pramenkom, istarskom i dubrovačkom ovcom, te Suffolk s romanovskom, istočnofrizijskom i bovškom ovcom. Iz tablice 17. može se zaključiti da je najmanji broj statistički značajnih razlika u distribuciji genotipova na lokusu 612 utvrđen između istarske ovce i ostalih šest istraživanih populacija.

Tablica 17. Razlike između utvrđenih genotipova na lokusu 612 između muflona i deset pasmina ovaca

Pasmina	Muflon	Bovška ovca	Cigaja	Dalmatinska pramenka	Dubrovačka ovca	Istarska ovca	Istočnofrizijska ovca	Lička pramenka	Paška ovca	Romanovska ovca	Suffolk
Muflon		61,653	52,109	61,833	48,769	44,720	23,513	48,454	59,894	24,691	31,971
Bovška ovca	***		21,061	31,388	1,927	7,353	10,924	9,644	7,031	7,951	3,936
Cigaja	***	***		0,593	12,480	3,740	24,195	6,845	7,671	23,281	23,100
Dalmatinska pramenka	***	***	NZ		19,936	7,552	33,714	11,991	13,651	32,531	32,679
Dubrovačka ovca	***	NZ	**	***		4,859	11,069	7,776	5,229	9,448	6,632
Istarska ovca	***	*	NZ	*	NZ		12,168	1,210	0,686	11,258	10,152
Istočnofrizijska ovca	***	**	***	***	**	**		10,088	12,594	0,213	1,646
Lička pramenka	***	**	*	**	*	NZ	**		0,681	9,098	8,685
Paška ovca	***	*	*	***	NZ	NZ	**	NZ		10,681	8,744
Romanovska ovca	***	*	***	***	**	**	NZ	*	**		0,656
Suffolk	***	NZ	***	***	*	**	NZ	*	*	NZ	

Iznad dijagonale nalaze se vrijednosti h^2 testa, a ispod dijagonale naznačene su razine značajnosti na osnovu p vrijednosti.

Kombinacija utvrđenih frekvencija polimorfizama MTNR1A gena na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena istraživanih pasmina ovaca prikazana je u grafikonu 14. i tablici 18.



Grafikon 14. Udio kombinacija genotipova na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena muflona i 10 pasmina ovaca

Tablica 18. Utvrđen broj i udio pojedine kombinacije genotipova s obzirom na prisutnost ili izostanak polimorfizma na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

Pasmina	L 606	L 612					
		GG		GA		AA	
		n	%	n	%	N	%
Muflon	CC	0	0,00	0	0,00	26	86,67
	CT	0	0,00	4	13,33	0	0,00
	TT	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Bovška ovca	CC	1	1,67	9	15,00	3	5,00
	CT	7	11,67	26	43,33	0	0,00
	TT	12	20,00	2	3,33	0	0,00
Cigaja	CC	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	CT	8	25,81	5	16,13	0	0,00
	TT	18	58,06	0	0,00	0	0,00
Dalmatinska pramenka	CC	3	7,50	1	2,50	0	0,00
	CT	16	40,00	3	7,50	0	0,00
	TT	17	42,50	0	0,00	0	0,00
Dubrovačka ovca	CC	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	CT	5	15,63	16	50,00	0	0,00
	TT	8	25,00	3	9,37	0	0,00
Istarska ovca	CC	2	6,67	2	6,67	1	3,33
	CT	5	16,67	7	23,33	0	0,00
	TT	12	40,00	1	3,33	0	0,00
Istočnofrizijska ovca	CC	0	0,00	1	2,62	10	26,32
	CT	0	0,00	16	42,11	0	0,00
	TT	10	26,32	0	0,00	1	2,63
Lička pramenka	CC	1	2,00	6	12,00	5	10,00
	CT	13	26,00	10	20,00	0	0,00
	TT	15	30,00	0	0,00	0	0,00
Paška ovca	CC	2	5,71	4	11,43	1	2,86
	CT	11	31,43	9	25,71	0	0,00
	TT	8	22,86	0	0,00	0	0,00
Romanovska ovca	CC	1	3,13	10	31,25	8	25,00
	CT	4	12,50	6	18,75	0	0,00
	TT	3	9,37	0	0,00	0	0,00
Suffolk	CC	0	0,00	8	22,86	4	11,43
	CT	1	2,85	12	34,29	2	5,71
	TT	8	22,86	0	0,00	0	0,00

S obzirom na vrstu i pasminu najmanji broj kombinacija je utvrđen u muflona (dvije kombinacije), dok je najveći broj kombinacija utvrđen u bovške ovce i istarske ovce (sedam kombinacija). U cigaje su utvrđene tri kombinacije, u dubrovačke ovce četiri kombinacije, u dalmatinske pramenke i istočnofrizijske ovce pet kombinacija, a u ličke pramenke, paške ovce, romanovske ovce i Suffolka utvrđeno je šest kombinacija genotipova lokusa 606 i 612 MTNR1A gena. Utvrđene dvije kombinacije genotipova s obzirom na prisutnost ili izostanak polimorfizma na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A

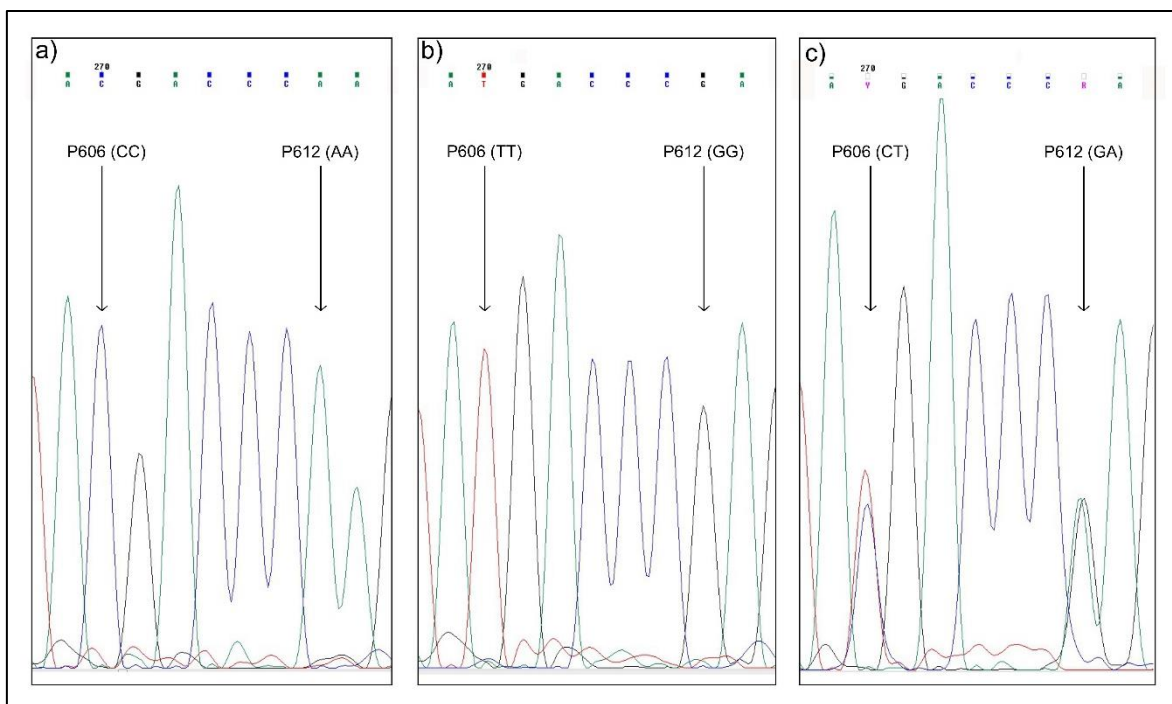
gena u muflona bile su CC606/AA612 i CT606/GA612, s udjelima 86,67% i 13,33%. Navedeni udio genotipa CC606/AA612 od 86,67% bio je najviši od svih preostalih kombinacija genotipova. Kombinacija genotipova, kada su na oba lokusa prisutni heterozigoti (CT606/GA612) bila je najučestalija u dubrovačke ovce (50,00%), zatim bovške ovce (43,33%), istočnofrizijske ovce CT/GA (42,11%) i Suffolka (34,29%). Kombinacija genotipova kada je na lokusu 606 prisutan homozigot TT, a na lokusu 612 homozigot GG (TT606/GG612) bila je najučestalija u cigaje (58,06%), dalmatinske pramenke (42,50%), istarske ovce (40,00%) i ličke pramenke (30,00%). U paške ovce je bila najučestalija kombinacija genotipova kad je na lokusu 606 bio prisutan heterozigot CT, a na lokusu 612 homozigot GG (CT606/GG612; 31,43%), dok je u romanovske ovce najučestalija kombinacija bila kada je na lokusu 606 bio prisutan homozigot CC, a na lokusu 612 heterozigot (CC606/GA612; 31,25%)

4.3. Slijed nukleotida drugog egzona MTNR1A gena

Slijed nukleotida na dijelu drugog egzona MTNR1A gena utvrđen je u muflona i 10 istraživanih pasmina ovaca čije jedinke su odabrane na osnovu genotipova na lokusu 612 utvrđenih *MnII* restrikcijskom endonukleazom. Dobiveni slijedovi nukleotida istraživanih jedinki, nakon uklanjanja nespecifičnih nukleotida s početka i kraja (dio gdje naliježu oligonukleotidne početnice) imali su dužinu od 758 nukleotida (prilog 3.). S obzirom da je referentni slijed nukleotida (U14109) dužine 1 150 nukleotida (prilog 2.), a dobiveni slijedovi 758 nukleotida, nakon poravnanja nalazili su se na poziciji 337 – 1 095 bp referentnog nukleotidnog slijeda. Navedeno poravnanje omogućilo je potvrdu prisutnosti ili izostanka polimorfizama na pozicijama 606 i 612 te identifikaciju novih polimorfizama u istraživanih jedinki (prilog 4.). Slijedom nukleotida na drugom egzonu MTNR1A gena potvrđena je prisutnost polimorfizma na lokusu 606 koji se očitovao s prisutnošću C (citozina) umjesto T (timina) i na lokusu 612 koji se očitovao s prisutnošću G (gvanina) umjesto A (adenina).

Na slici 19. prikazan je odsječak slijeda nukleotida drugog egzona MTNR1A gena ovaca na kojem je vidljiv slijed nukleotida na pozicijama 606 i 612 s prisutnošću sva tri genotipa na oba lokusa. Na slici 19a) na poziciji 606 s jasno vidljivim pikom prisutan je citozina (C) što sugerira prisutnost homozigota genotipa CC, dok je na poziciji 612 prisutan adenina (A), odnosno homozigot AA. Na slici 19b) prisutan je timina (T) na poziciji 606 odnosno homozigot TT, dok je homozigot GG na poziciji 612 uvjetovan prisutnošću gvanina (G). Na slici 19c) na oba lokusa prisutni su heterozigoti što je vidljivo

s podjednakom veličinom vrhova citozina (C) i timina (T) na poziciji 606, odnosno gvanina (G) i adenina (A) na poziciji 612.



Slika 18. Prikaz odsječka slijeda nukleotida drugog egzona MTNR1A gena s označenim pozicijama polimorfizama; a) lokus 606 – homozigot CC, lokus 612 – homozigot AA; b) lokus 606 –homozigot TT, lokus 612 –homozigot GG; c) lokus 606 – heterozigot (CT), lokus 612 – heterozigot (GA)

Osim potvrde prisutnosti ili izostanka polimorfizama na pozicijama 606 i 612 drugog egzona MTNR1A gena, određivanjem slijeda nukleotida i usporedbe s referentnim nukleotidnim slijedom utvrđena je prisutnost polimorfizama na još 6 pozicija MTNR1A gena (tablica 19.).

Tablica 19. Pozicije mutacija te promjene baza i aminokiseline na istraživanom odsječku DNK drugog egzona MTNR1A gena

Pozicija mutacije	Promjena baze (nukleotida)	Promjena aminokiseline i pozicija
453	G → T	Nema promjene
606	C → T	Nema promjene
612	G → A	Nema promjene
706	G → A	Val → Ile 220
783	G → A	Nema promjene
801	G → A	Nema promjene
891	C → T	Nema promjene
893	C → A	Ala → Asp 282

Promjenom nukleotida na pozicijama 706 i 893 došlo je do promjene aminokiseline valin u izoleucin na poziciji 220 i aminokiseline alanin u asparginsku kiselinu na poziciji 282. Mutacije utvrđene na preostalim pozicijama MTNR1A gena nisu bile funkcionalne te nije došlo do promjene aminokiseline.

Razlike u mutacijama između genotipova na lokusu 612 utvrđenih s *MnII* restrikcijskom endonukleazom prikazane su u tablici 20.

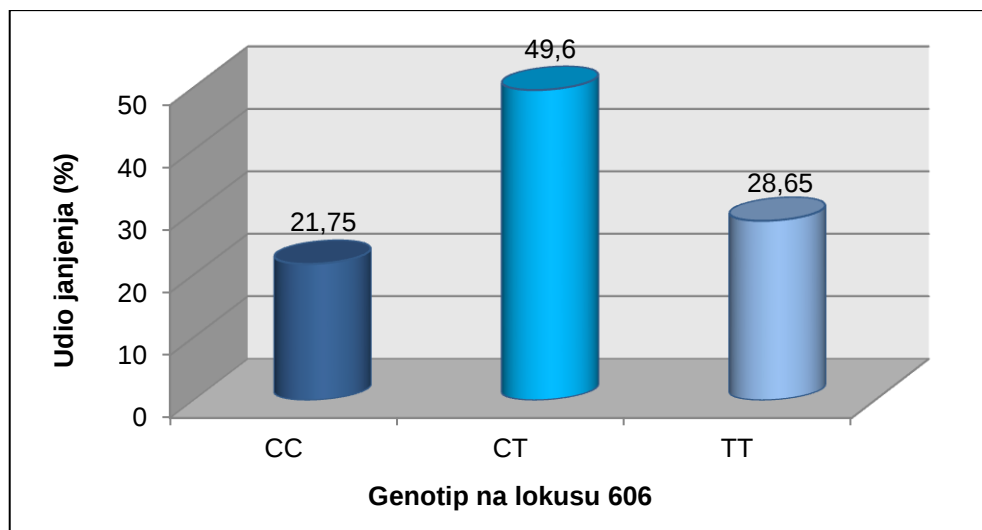
Tablica 20. Utvrđene mutacije na istraživanom odsječku DNK drugog egzona MTNR1A gena s obzirom na genotip na lokusu 612

Pozicija mutacije	Lokusu 612		
	Genotip GG	Genotip GA	Genotip AA
453	-	+	+
606	+	+	+
612	+	+	+
706	-	+	+
783	+	-	-
801	+	-	-
891	-	+	+
893	+	-	-

Vidljivo je da su mutacije na pozicijama 453, 706 i 891 u istraživanim jedinki uvijek bile povezane s izostankom polimorfizma na lokusu 612 MTNR1A gena (genotip AA i GA). Nasuprot navedenom mutacija na poziciji 783 uvijek je bila povezana s prisutnošću polimorfizma na lokusu 612 (genotip GG), dok su mutacije utvrđene na pozicijama 606, 801 i 891 istraživanog odsječka DNK bile prisutne u sva tri genotipa (tablica 20.).

4.4. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na sezonu janjenja

Distribucija janjenja istraživanih ovaca s obzirom na polimorfizam na lokusu 606 MTNR1A gena prikazana je u grafikonu 15. i tablici 21.



Grafikon 15. Distribucija janjenja ovaca s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena

Od ukupno evidentiranih 1 278 janjenja gotovo polovicu su ostvarile jedinke CT genotipa (49,61%), zatim TT genotipa (28,64%), a najmanje jedinke CC genotipa (21,75%; grafikon 15.).

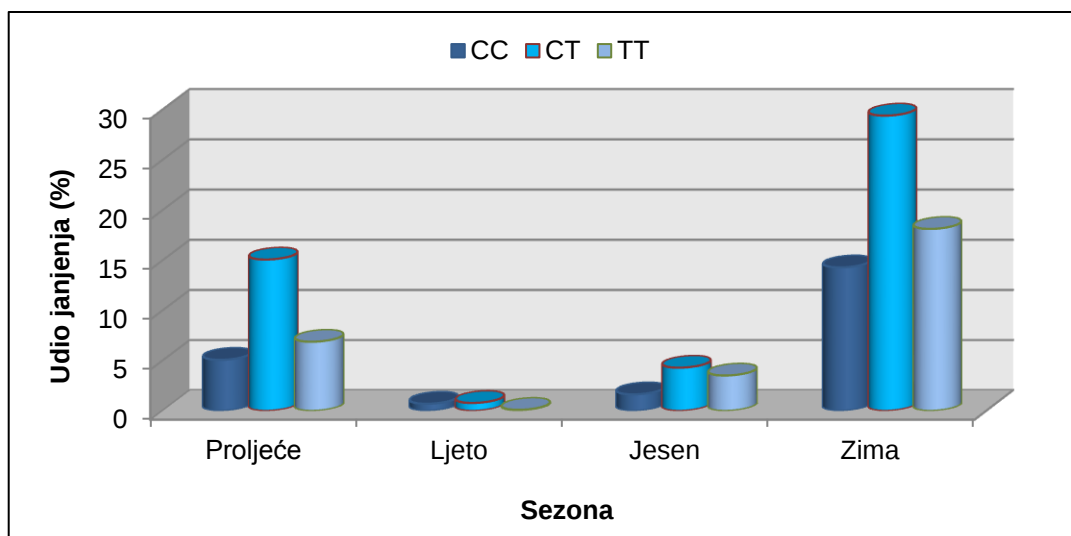
Tablica 21. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena

Sezona janjenja	Lokus 606						UKUPNO	
	Genotip CC		Genotip CT		Genotip TT			
	n	%	n	%	n	%	n	%
Proljeće	65	5,09	193	15,10	88	6,89	346	27,08
Ljeto	9	0,70	10	0,78	1	0,09	20	1,57
Jesen	21	1,64	55	4,30	45	3,52	121	9,46
Zima	183	14,32	376	29,42	232	18,15	791	61,89
UKUPNO	278	21,75	634	49,60	366	28,65	1278	100,00

n – broj ojanjenih životinja po sezoni; % - udio ojanjenih životinja po sezoni.

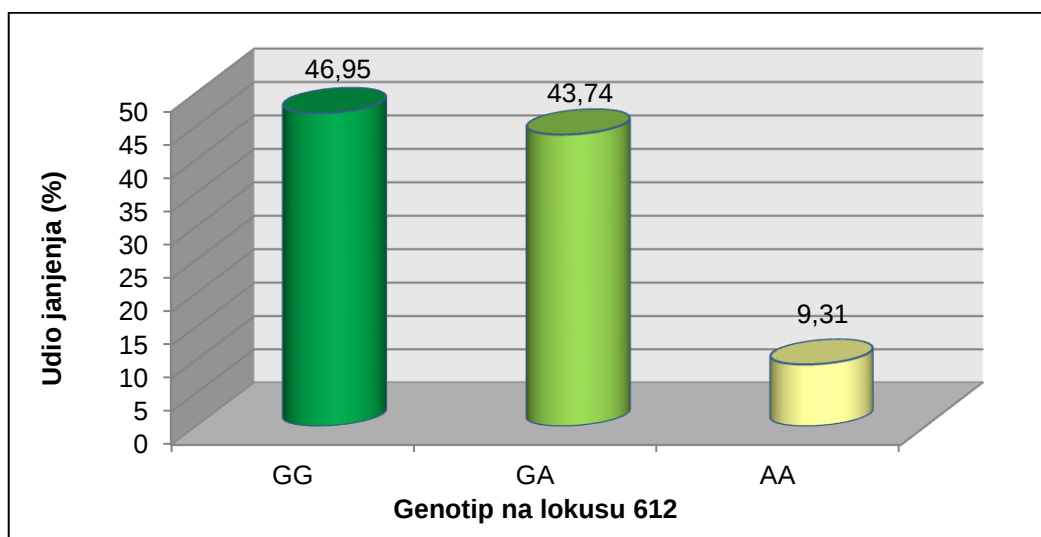
Navedena distribucija janjenja je bila i očekivana s obzirom da su udjeli navedenih genotipova na lokusu 606 iznosili 26,39% CC, 45,04% CT i 28,57% TT. Najveći broj janjenja u proljeće utvrđen je u ovaca CT genotipa (193 janjenja), a najmanji u ovaca genotipa CC (65 janjenja), dok su ovce TT genotipa ostvarile 88 janjenja. Iako je ljeti, u odnosu na preostale sezone, evidentiran najmanji broj janjenja, podjednak je udio ovaca CC i CT genotipa koje su se janjile ljeti. S obzirom na genotip na poziciji 606 u jesen i zimu se janjilo više ovaca CT i TT genotipa (4,30% i 3,52%, odnosno 29,42% i 18,15%) u odnosu na ovce genotipa CC (1,64% i 14,32%; grafikon 16.).

Distribucija janjenja istraživanih ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena prikazana je u grafikonu 16.



Grafikon 16. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena

Distribucija janjenja ovaca s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena prikazana je u grafikonu 17.



Grafikon 17. Distribucija janjenja ovaca s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena

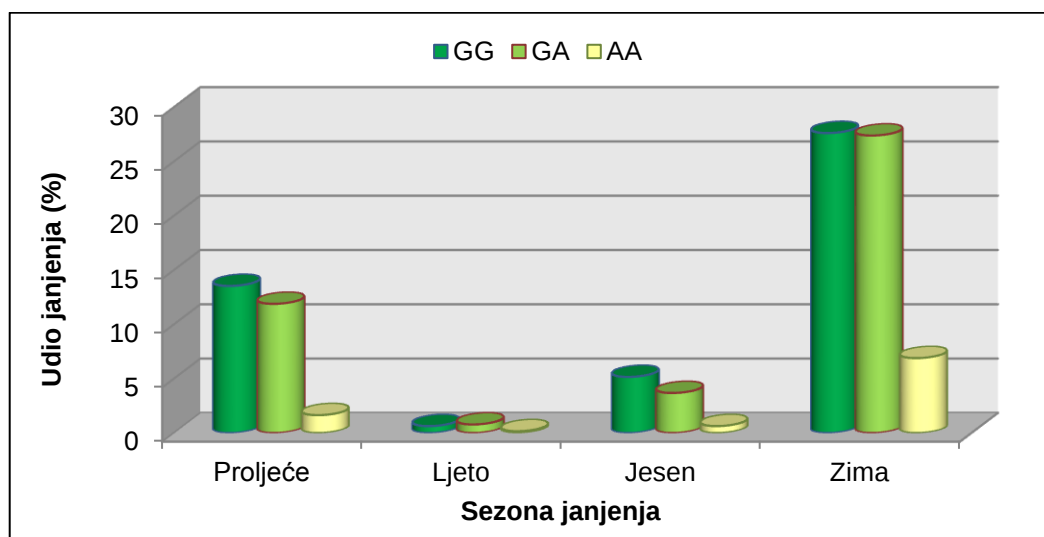
S obzirom na utvrđeni genotip na lokusu 612 u tablici 22. je prikazana distribucija janjenja po sezonama istraživanih ovaca.

Tablica 22. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena

Sezona janjenja	Lokus 612						UKUPNO	
	Genotip GG		Genotip GA		Genotip AA			
	n	%	n	%	n	%	n	%
Proljeće	173	13,54	152	11,89	21	1,64	346	27,07
Ljeto	8	0,63	10	0,78	2	0,16	20	1,57
Jesen	66	5,16	47	3,68	8	0,63	121	9,47
Zima	353	27,62	350	27,39	88	6,89	791	61,89
UKUPNO	600	46,95	559	43,74	119	9,31	1278	100,00

Ukupno, najveći broj janjenja ostvarile su ovce genotipa GG (46,95%), zatim ovce genotipa GA (43,74%), a najmanje ovce genotipa AA (9,31%; grafikon 15.) što se podudara s utvrđenim udjelima navedenih genotipova na lokusu 612 (GG 46,25%, GA 38,98% i AA 14,77%).

Na poziciji 612 MTNR1A gena utvrđene su veće frekvencije GG i GA genotipa koji dominiraju po broju janjenja u svim istraživanim sezonama. Nasuprot navedenom, u svim sezonama se najmanje janjilo ovaca genotipa AA čiji je i udio bio najmanji (grafikon 18. i tablica 22.). Najveći broj janjenja, bez obzira na genotip, istraživane jedinke su ostvarile tijekom zime i proljeća što ne čudi, s obzirom da je u istraživanom uzorku bilo najviše pasmina koje odlikuje sezonska pojava estrusa, a samim time i sezonsko janjenje.



Grafikon 18. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena

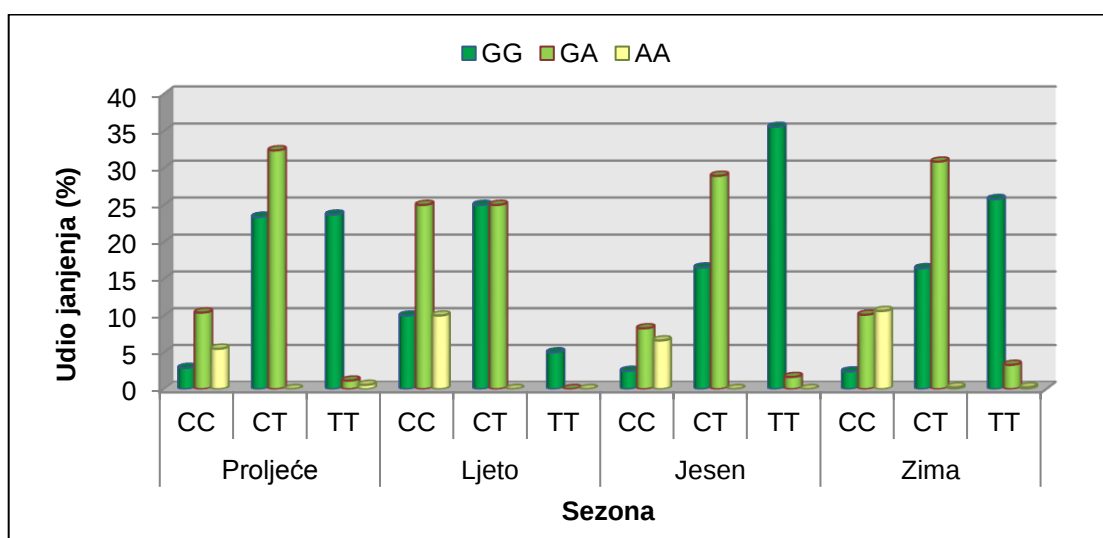
Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na kombinaciju polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 prikazana je u tablici 23.

Tablica 23. Distribucija janjenja po sezonama s obzirom na polimorfizam na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

Sezona janjenja	L 612	L 606						UKUPNO	
		CC		CT		TT			
		n	%	n	%	n	%	n	%
Proljeće	GG	10	2,89	81	23,41	82	23,70	173	50,00
	GA	36	10,40	112	32,37	4	1,16	152	43,93
	AA	19	5,49	0	0,00	2	0,58	21	6,07
	Σ	65	18,79	193	55,78	88	25,44	346	100,00
Ljeto	GG	2	10,00	5	25,00	1	5,00	8	40,00
	GA	5	25,00	5	25,00	0	0,00	10	50,00
	AA	2	10,00	0	0,00	0	0,00	2	10,00
	Σ	9	45,00	10	50,00	1	5,00	20	100,00
Jesen	GG	3	2,48	20	16,53	43	35,54	66	54,55
	GA	10	8,26	35	28,93	2	1,65	47	38,84
	AA	8	6,61	0	0,00	0	0,00	8	6,61
	Σ	21	17,36	55	45,45	45	37,19	121	100,00
Zima	GG	19	2,40	130	16,43	204	25,79	353	44,62
	GA	80	10,11	244	30,85	26	3,30	350	44,26
	AA	84	10,62	2	0,25	2	0,25	88	11,12
	Σ	183	23,13	376	47,53	232	29,34	791	100,00

L – lokus; Σ – suma

Po broju janjenja u proljeće se najviše janjilo ovaca genotipa CT606/GA612 (32,37%), zatim TT606/GG612 (23,70%) i CT606/GG612 (23,41%). Ljeti je jednak broj janjenja utvrđen u ovaca genotipa CC606/GA612, CT606/GG612 i CT/606GA612 (25,00%). Ovce genotipa TT606/GG612 te CT606/GA612 najviše su se janjile u jesen, a ovce genotipa CT606/GA612 i TT606/GG612 zimi (grafikon 19. i tablica 23.).



Grafikon 19. Distribucija janjenja ovaca po sezonama s obzirom na kombinaciju genotipova na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

U tablici 24. prikazan je broj i postotni udio janjenja ovaca po sezonama s obzirom na pasminu i prisutnost polimorfizma na lokusu 606 MTNR1A gena.

Tablica 24. Ukupan broj i udio janjenja po sezonama istraživanih pasmina ovaca s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena

Pasmina	L 606	Sezona								UKUPNO	
		Proljeće		Ljeto		Jesen		Zima			
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bovška ovca	CC	35	11,74	0	0,00	0	0,00	25	8,39	60	20,13
	CT	109	36,58	1	0,34	0	0,00	59	19,80	169	56,72
	TT	47	15,77	0	0,00	0	0,00	22	7,38	69	23,15
	Σ	191	64,09	1	0,34	0	0,00	106	35,57	298	100,00
Cigaja	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CT	7	15,22	6	13,04	6	13,04	5	10,87	24	52,17
	TT	3	6,52	1	2,18	8	17,39	10	21,74	22	47,83
	Σ	10	21,74	7	15,22	14	30,43	15	32,61	46	100,00
Dalmatinska pramenka	CC	7	4,93	0	0,00	0	0,00	9	6,34	16	11,27
	CT	31	21,83	0	0,00	1	0,70	36	25,35	68	47,89
	TT	15	10,57	0	0,00	0	0,00	43	30,28	58	40,85
	Σ	53	37,33	0	0,00	1	0,70	88	61,97	142	100,00
Dubrovača ovca	CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CT	9	16,36	0	0,00	4	7,27	29	52,73	42	76,36
	TT	0	0,00	0	0,00	2	3,64	11	20,00	13	23,64
	Σ	9	16,36	0	0,00	6	10,91	40	72,73	55	100,00
Istarska ovca	CC	3	4,00	0	0,00	2	2,67	8	10,67	13	17,33
	CT	1	1,33	0	0,00	2	2,67	34	45,33	37	49,33
	TT	1	1,33	0	0,00	5	6,67	19	25,33	25	33,33
	Σ	5	6,66	0	0,00	9	12,01	61	81,33	75	100,00
Istočnofrizijska ovca	CC	3	2,04	0	0,00	0	0,00	40	27,21	43	29,25
	CT	6	4,08	0	0,00	0	0,00	56	38,10	62	42,18
	TT	5	3,40	0	0,00	0	0,00	37	25,17	42	28,57
	Σ	14	9,52	0	0,00	0	0,00	133	90,48	147	100,00
Lička pramenka	CC	7	3,26	0	0,00	13	6,05	44	20,47	64	29,78
	CT	14	6,50	0	0,00	18	8,37	63	29,30	95	44,17
	TT	3	1,40	0	0,00	14	6,51	39	18,14	56	26,05
	Σ	24	11,16	0	0,00	45	20,93	146	67,91	215	100,00
Paška ovca	CC	4	1,75	5	2,19	5	2,19	32	14,05	46	20,18
	CT	12	5,26	1	0,44	22	9,65	79	34,65	114	50,00
	TT	12	5,26	0	0,00	14	6,14	42	18,42	68	29,82
	Σ	28	12,28	6	2,63	41	17,98	153	67,11	228	100,00
Romanovska ovca	CC	6	27,27	4	18,17	0	0,00	2	9,09	12	54,53
	CT	1	4,55	2	9,09	2	9,09	1	4,55	6	27,28
	TT	1	4,55	0	0,00	1	4,55	2	9,09	4	18,19
	Σ	8	36,37	6	27,26	3	13,64	5	22,73	22	100,00
Suffolk	CC	0	0,00	0	0,00	1	2,00	23	46,00	24	48,00
	CT	3	6,00	0	0,00	0	0,00	14	28,00	17	34,00
	TT	1	2,00	0	0,00	1	2,00	7	14,00	9	18,00
	Σ	4	8,00	0	0,00	2	4,00	44	88,0	50	100,00

Ovisno o pasmini distribucije janjenja ovaca po sezonama s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena uvelike su se razlikovale. U bovške ovce, najveći ukupni broj janjenja ostvarile su jedinice genotipa CT (56,71% janjenja). Bez obzira na genotip na lokusu 606 ovce bovške pasmine najviše su se janjile u proljeće (64,09%), a koje je glavna sezona janjenja ovaca u našim područjima. U cigaje je evidentirano više janjenja u proljeće i ljeto u jedinki CT genotipa, dok je u jesen i zimu evidentirano više janjenja TT genotipa (17,39% i 21,74%). U dalmatinske pramenke gotovo sva janjenja su bila tijekom proljeća i zime, s tim da se u proljeće najviše ojanjilo ovaca CT genotipa (21,83%), u zimi ovaca TT genotipa (30,28%), dok su se ovce CC genotipa podjednako janjile u proljeće i zimu (4,93% i 6,34%). Jedinice genotipa CT su imale najveći broj janjenja u svim sezonama u kojima su evidentirana janjenja dubrovačke ovce, a najviše zimi 52,73%. Najveći broj janjenja istarske ovce ostvarile su jedinice CT genotipa i to zimi (45,33%) tijekom najfrekventnije sezone. U istočnofrizijske ovce više od 90% janjenja je evidentirano zimi, a najfrekventniji genotip po broju janjenja je bio CT (38,10%), zatim CC (27,21%) i TT (25,17%). Lička pramenka je imala evidentirana janjenja u proljeće (11,16%), jesen (20,93%) i zimu (67,91%), a u sve tri sezone po broju janjenja dominirao je genotip CT. Polovicu svih janjenja ostvarile su paške ovce genotipa CT (50,00%) i to tijekom zime (34,65%). Najveći broj janjenja genotipova CC i TT paške ovce također je evidentiran zimi (14,04% i 18,42%). U romanovske ovce najveći broj evidentiranih janjenja imale su ovce genotipa CC (54,53%) i to tijekom proljeća (27,27%) i ljeta (18,17%). Također najveći broj janjenja Suffolk pasmine evidentiran u ovaca genotipa CC (48,00%), ali tijekom zime (46,00%). U navedene pasmine, ovce genotipa CT imale su 34,00% janjenja i to najviše tijekom zime (28,00%).

S obzirom na polimorfizam na lokusu 612 distribucija janjenja po sezonama istraživanih pasmina ovaca prikazana je u tablici 25.

Tablica 25. Ukupan broj i udio janjenja po sezonama istraživanih pasmina ovaca s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena

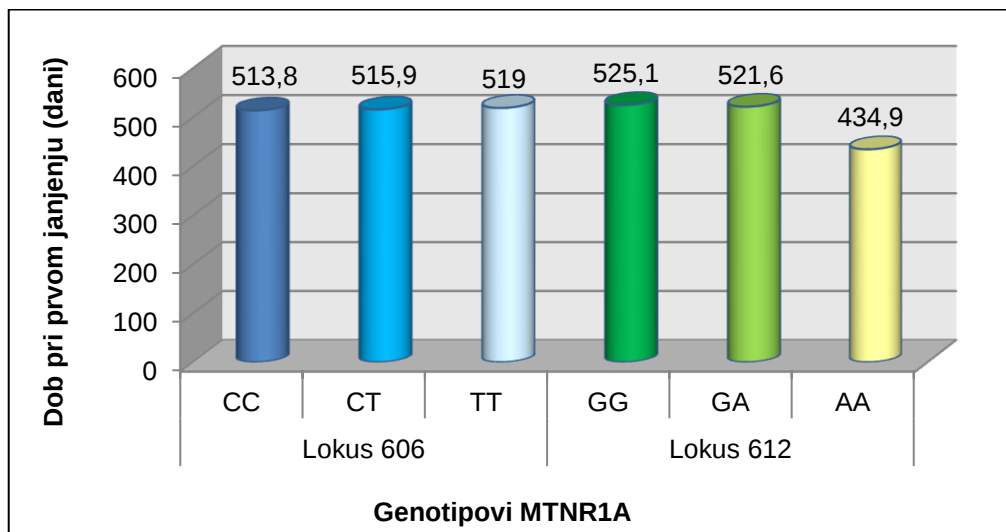
Pasmina	L 612	Sezona								UKUPNO	
		Proljeće		Ljeto		Jesen		Zima			
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bovška ovca	GG	77	25,84	0	0,00	0	0,00	19	6,38	96	32,22
	GA	105	35,23	1	0,34	0	0,00	83	27,85	189	63,42
	AA	9	3,02	0	0,00	0	0,00	4	1,34	13	4,36
	Σ	191	64,09	1	0,34	0	0,00	106	35,57	298	100,00
Cigaja	GG	9	19,57	5	10,87	8	17,39	13	28,26	35	76,09
	GA	1	2,17	2	4,35	6	13,04	2	4,35	11	23,91
	AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Σ	10	21,74	7	15,22	14	30,43	15	32,61	46	100,00
Dalmatinska pramenka	GG	47	33,10	0	0,00	1	0,70	78	54,93	126	88,73
	GA	6	4,23	0	0,00	0	0,00	10	7,04	16	11,27
	AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Σ	53	37,33	0	0,00	1	0,70	88	61,97	142	100,00
Dubrovača ovca	GG	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	3,64	2	3,64
	GA	9	16,36	0	0,00	6	10,91	38	69,09	53	96,36
	AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Σ	9	16,36	0	0,00	6	10,91	40	72,73	55	100,00
Istarska ovca	GG	0	0,00	0	0,00	8	10,67	30	40,00	38	50,67
	GA	5	6,67	0	0,00	1	1,33	27	36,00	33	44,00
	AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	4	5,33	4	5,33
	Σ	5	6,67	0	0,00	9	12,00	61	81,33	75	100,00
Istočnofrizijska ovca	GG	3	2,04	0	0,00	0	0,00	35	23,81	38	25,85
	GA	6	4,08	0	0,00	0	0,00	58	39,46	64	43,54
	AA	5	3,40	0	0,00	0	0,00	40	27,21	45	30,61
	Σ	14	9,52	0	0,00	0	0,00	133	90,48	147	100,00
Lička pramenka	GG	15	6,98	0	0,00	27	12,56	78	36,28	120	55,82
	GA	7	3,25	0	0,00	13	6,05	47	21,86	67	31,16
	AA	2	0,93	0	0,00	5	2,33	21	9,76	28	13,02
	Σ	24	11,16	0	0,00	45	20,94	146	67,90	215	100,00
Paška ovca	GG	18	7,89	3	1,32	20	8,77	89	39,04	130	57,02
	GA	8	3,51	2	0,88	19	8,32	53	23,25	82	35,96
	AA	2	0,88	1	0,44	2	0,88	11	4,82	16	7,02
	Σ	28	12,28	6	2,63	41	17,97	153	67,11	228	100,00
Romanovska ovca	GG	2	9,08	0	0,00	1	4,55	2	9,09	5	22,73
	GA	3	13,64	5	22,73	2	9,08	3	13,64	13	59,09
	AA	3	13,64	1	4,55	0	0,00	0	0,00	4	18,18
	Σ	8	36,36	6	27,28	3	13,63	5	22,73	22	100,00
Suffolk	GG	2	4,00	0	0,00	1	2,00	7	14,00	10	20,00
	GA	2	4,00	0	0,00	0	0,00	29	58,00	31	62,00
	AA	0	0,00	0	0,00	1	2,00	8	16,00	9	18,00
	Σ	4	8,00	0	0,00	2	4,00	44	88,00	50	100,00

U bovške ovce glavne sezone janjenja bile su proljeće i zima u kojima je po broju evidentiranih janjenja dominirao genotip GA s ukupno 189 janjenja ili 63,42%, dok je u

istim sezonama evidentirano 32,21% janjenja genotipa GG. Veći broj janjenja oba genotipa bio je tijekom proljeća u odnosu na zimu, odnosno, 28,84% naspram 6,38% GG genotipa i 35,23% naspram 27,85% GA genotipa. U cigaje se distribucija janjenja između utvrđenih genotipova uvelike razlikovala, s obzirom da genotip AA nije utvrđen, dok su ostala dva genotipa evidentirana u sve četiri sezone. U cigaje je po broju janjenja dominirao genotip GG sa 76,09% svih janjenja i to tijekom zime (28,26%), dok je najmanje janjenja evidentirano tijekom ljeta (10,87%). Nasuprot navedenom jedinke genotipa GA najčešće su se janjile tijekom jeseni (13,04%), a najmanje u proljeće (2,17%). Kao i u cigaje, u dalmatinske pramenke i dubrovačke ovce, genotip AA nije utvrđen, a po broju janjenja u populaciji dalmatinske pramenke dominirao je genotip GG (88,73%), a u dubrovačke ovce genotip GA (96,36%). U obje pasmine najveći broj janjenja evidentiran je zimi, 54,93% genotipa GG u ovaca dalmatinske pramenke i 69,09% genotipa GA u dubrovačke ovce. Distribucija janjenja istarske ovce genotipa GG i GA bila je podjednaka (50,67% i 44,00%), a najveći broj janjenja u oba genotipa utvrđen je zimi (40,00% i 36,00%). Najujednačenija distribucija janjenja između sva tri navedena genotipa utvrđena je u istočnofrizijske ovce: GG (25,85%), GA (43,54%) i AA (30,61%), a glavnina janjenja utvrđena je tijekom zime (90,48%) od kojih je najučestaliji bio genotip GA (39,46%). U ovaca ličke pramenke više od polovice svih evidentiranih janjenja ostvarile su jedinke genotipa GG (55,82%), dok su jedinke GA genotipa ostvarile 31,16% janjenja. Iako su se ovce ličke pramenke janjile u tri sezone (proljeće, jesen i zimu) glavnina janjenja je evidentirana zimi (oko 68%). Potrebno je naglasiti da je više od 20% janjenja evidentirano u jesen, a u sve tri sezone po broju janjenja dominirale su ovce genotipa GG (6,98%; 12,56%; 36,28%). Slično kao i u ličke pramenke, u paške ovce najviše janjenja utvrđeno je u ovaca GG genotipa (57,02%), a zatim GA genotipa (35,96%). Glavna sezona janjenja paške ovce također je bila zimi u kojoj je po broju utvrđenih janjenja najučestaliji bio genotip GG (39,04%). Jedinke navedenog genotipa ostvarile su najveći broj janjenja i u preostale tri sezone i to kako slijedi: proljeće 7,89%, ljeto 1,32% i jesen 8,77%. U sve četiri sezone utvrđena su janjenja i u preostala dva genotipa samo u manjem broju i udjelima (tablica 25.). Distribucija janjenja između sva tri genotipa na lokusu 612 romanovske ovce i Suffolk pasmine vrlo je ujednačena, a najveći broj janjenja je evidentiran u ovaca genotipa GA (59,09% i 62,00%). U romanovske ovce distribucija janjenja bila je podjednaka tijekom sve četiri sezone tijekom kojih je genotip GA bio najučestaliji i to najviše ljeti (22,73%). Nasuprot navedenom u Suffolk pasmine glavna sezona janjenja bila je zima (88% janjenja), a najveći broj janjenja imale su ovce genotipa GA (58%).

4.5. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju

U grafikonu 20. prikazan je utjecaj polimorfizma na lokusu 606 i lokusu 612 na dob ovce prilikom prvog janjenja.



Grafikon 20. Utjecaj polimorfizma MTNR1A gena na lokusu 606 i 612 na dob ovaca pri prvom janjenju

Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na genotip na lokusu 606 bila je vrlo ujednačena i kretala se u rasponu od 513,8 dana (genotip CC) do 519 dana (genotip TT; tablica 26.). Nasuprot navedenom, na lokusu 612 MTNR1A gena vidljivo je da je genotip AA najpovoljnije utjecao na dob ovaca prilikom prvog janjenja (434,9 dana), dok je prosječna dob ovaca pri prvom janjenju genotipa GG bila 525,1 dan, a genotipa GA 521,6 dana. Najmanje i najveće vrijednosti dobi ovaca pri prvom janjenju također su bile izjednačena između istraživanih genotipova, s tim da je najmanja vrijednost dobi pri prvom janjenju utvrđena u ovaca CC genotipa (257 dana).

Tablica 26. Opisna statistika dobi ovaca pri prvom janjenju s obzirom na polimorfizam na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

Polimorfizam		n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
Lokus 606	CC	66	513,8	164,0	257,0	780,0
	CT	162	515,9	149,9	228,0	815,0
	TT	100	519,0	156,9	312,0	825,0
Lokus 612	GG	162	525,1	153,2	312,0	825,0
	GA	140	521,6	158,4	228,0	815,0
	AA	26	434,9	118,0	320,0	749,0

n – utvrđen broj genotipova; $\bar{x}$ – prosječna vrijednost; Sd – standardna devijacija; Min – najmanja vrijednost; Maks – najveća vrijednost.

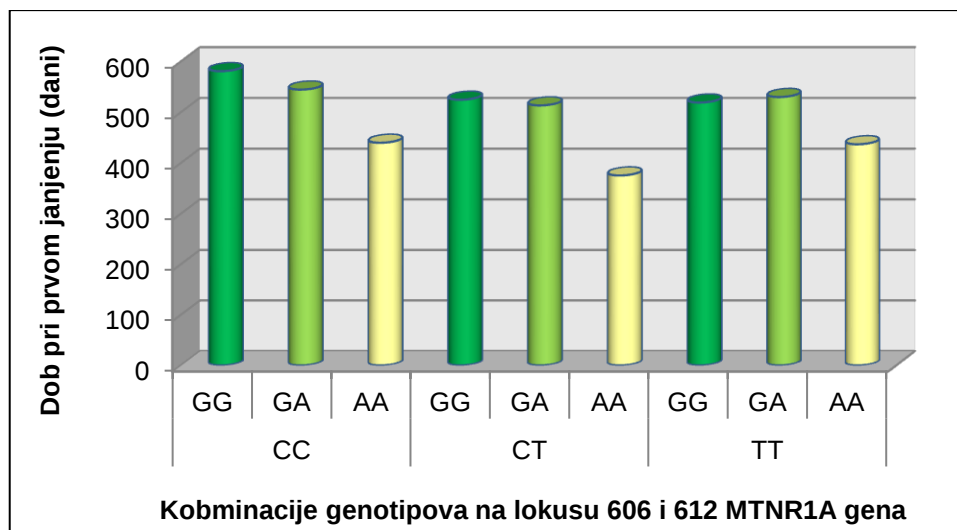
Utjecaj polimorfizma na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju prikazan je u tablici 27. S obzirom na polimorfizme navedenih lokusa vrijednosti zbroja najmanjih kvadrata za dob pri prvom janjenju vrlo su izjednačene. Jedinke genotipa AA prvi put su se ojanjile u dobi od 468 dana (tablica 27.). Prisutnost polimorfizama na lokusima 606 i 612 nije ima statistički značajan utjecaj na raniji ulazak ovaca u reprodukciju, a samim time i na dob pri prvom janjenju.

Tablica 27. Utjecaj polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju (LSMEANS $\pm$ SE)

L 606	LSMEANS $\pm$ SE	L 612	LSMEANS $\pm$ SE
CC	509,52 $\pm$ 23,77	GG	505,13 $\pm$ 19,18
CT	504,44 $\pm$ 17,81	GA	511,26 $\pm$ 18,19
TT	499,87 $\pm$ 20,56	AA	467,98 $\pm$ 33,55

LSMEANS $\pm$ SE – prosjek suma najmanjih kvadrata $\pm$ standardna greška

Utjecaj kombinacije polimorfizama MTNR1A gena (lokus 606 i 612) na dob jedinke prilikom prvog janjenja prikazan je u grafikonu 21.



Grafikon 21. Utjecaj kombinacije genotipova na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju

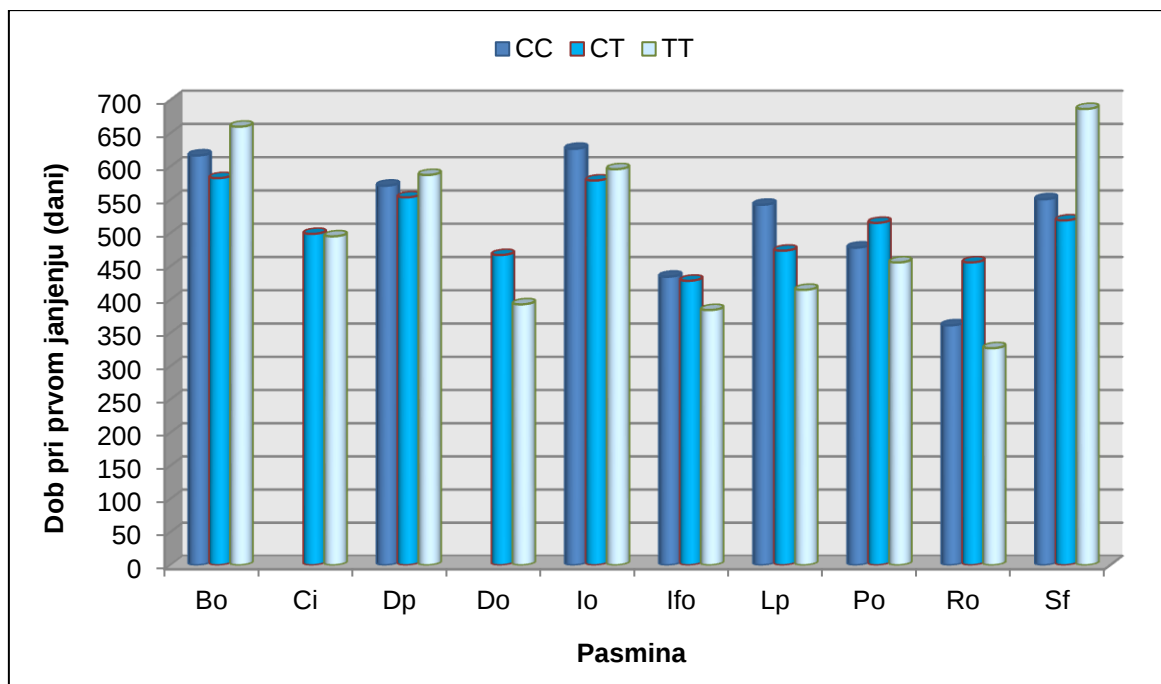
Promatrajući istovremeno polimorfizam na lokusu 606 i 612 vidljivo je da je kombinacija CT606/AA612 najpovoljnije utjecala na raniji ulazak ovaca u reprodukciju te su se jedinke navedenog genotipa janjile s prosječnom dobi od 375,5 dana (tablica 28.). Nasuprot navedenom kombinacija polimorfizma CC/GG (606/612) imala je najlošiji utjecaj na navedeno svojstvo te su se jedinke navedenog genotipa janjile s prosječnom dobi od 587,9 dana.

Tablica 28. Opisna statistika kombinacije polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju

L 606	L 612	n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
CC	GG	10	581,1	148,7	333,0	755,0
	GA	33	544,8	177,3	257,0	780,0
	AA	23	440,0	124,3	320,0	749,0
CT	GG	58	524,8	147,4	337,0	805,0
	GA	102	513,6	152,1	228,0	815,0
	AA	2	375,5	2,1	374,0	377,0
TT	GG	94	519,3	157,5	312,0	825,0
	GA	5	530,2	174,8	391,0	755,0
	AA	1	437,0	-	437,0	437,0

n – utvrđen broj genotipova; $\bar{x}$ – prosječna vrijednost; Sd – standardna devijacija; Min – najmanja vrijednost; Maks – najveća vrijednost.

U grafikonu 22. prikazana je prosječna dob ovaca pri prvom janjenju po pasminama s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena.



Grafikon 22. Dob ovaca pri prvom janjenju po pasminama s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena

Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 606 MTNR1A gena prikazan je u tablici 29. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da su se u šest pasmina (cigaja, dubrovačka ovca, istočnofrizijska ovca, lička pramenka, paška ovca i romanovska ovca) u najranijoj dobi janjile ovce TT genotipa, u pet pasmina (bovška ovca, dalmatinska pramenka, istarska ovca i Suffolk) ovce CT genotipa, dok se jedinice CC genotipa nisu najranije janjile niti u jedne pasmine ovaca. Dob ovaca pri prvom janjenju između 10 pasmina bila je raznolika. Tako su se u najranijoj dobi, s manje od godinu dana, janjile jedinice romanovske ovce TT genotipa (327 dana), dok je najduže neproduktivno razdoblje od 686,6 dana utvrđeno u Suffolk ovaca TT genotipa.

Tablica 29. Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 606 MTNR1A gena

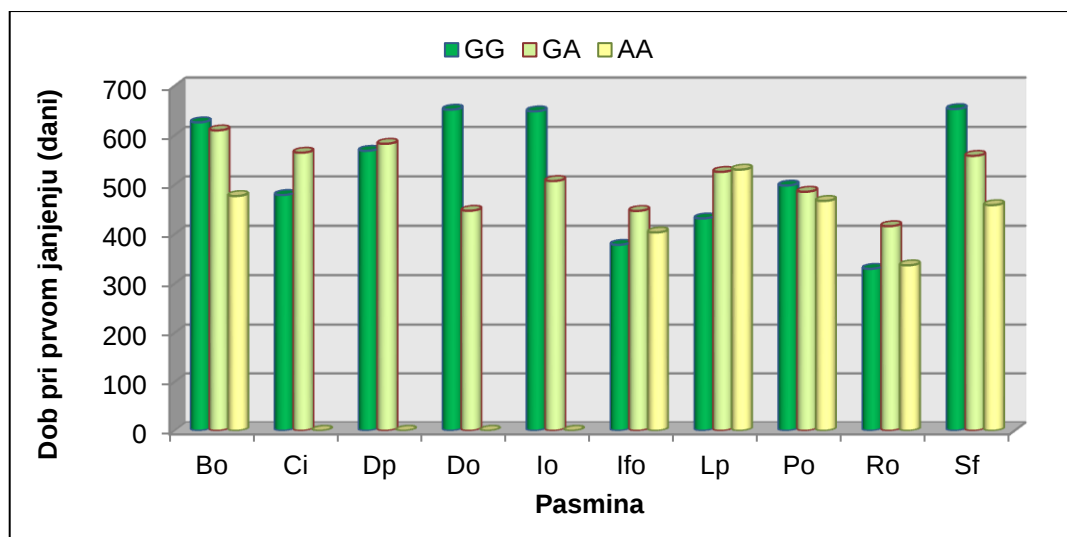
Pasmina	L 606	n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
Bovška ovca	CC	12	616,7	183,5	324,0	780,0
	CT	31	582,7	174,8	341,0	762,0
	TT	14	660,0	140,8	384,0	755,0
Cigaja	CC	-	-	-	-	-
	CT	9	498,9	93,1	337,0	629,0
	TT	16	495,2	135,2	312,0	776,0
Dalmatinska pramenka	CC	4	571,3	201,2	339,0	743,0
	CT	18	553,8	158,6	401,0	798,0
	TT	17	587,4	172,6	354,0	806,0
Dubrovačka ovca	CC	-	-	-	-	-
	CT	16	467,1	84,1	347,0	652,0
	TT	2	393,0	2,8	391,0	395,0
Istarska ovca	CC	3	626,7	179,1	422,0	755,0
	CT	10	579,1	163,9	428,0	805,0
	TT	7	596,1	144,0	430,0	734,0
Istočnofrizijska ovca	CC	10	434,5	112,1	369,0	746,0
	CT	16	428,4	116,4	343,0	749,0
	TT	10	384,4	29,8	337,0	437,0
Lička pramenka	CC	8	542,6	151,4	404,0	751,0
	CT	21	473,6	120,1	358,0	719,0
	TT	14	414,7	35,8	325,0	451,0
Paška ovca	CC	11	478,2	64,8	371,0	539,0
	CT	28	515,4	137,3	357,0	751,0
	TT	14	455,9	113,4	367,0	825,0
Romanovska ovca	CC	8	361,3	101,3	257,0	599,0
	CT	3	456,0	314,7	228,0	815,0
	TT	1	327,0	-	327,0	327,0
Suffolk	CC	10	550,9	195,0	352,0	767,0
	CT	10	519,1	164,5	374,0	781,0
	TT	5	686,6	162,8	398,0	782,0

n – utvrđen broj genotipova; $\bar{x}$ – prosječna vrijednost; Sd – standardna devijacija; Min – najmanja vrijednost; Maks – najveća vrijednost.

Uz romanovsku ovcu genotipa CC i genotipa TT, dob pri prvom janjenju niža od 400 dana utvrđena je još u dubrovačke i istočnofrizijske ovce TT genotipa (393 dana i 384,4 dana). Dob pri prvom janjenju između 400 i 500 dana evidentirana je u pet pasmina sva tri genotipa i to: cigaje CT i TT genotipa (498,9 dana i 495,2 dana), dubrovačke ovce CT genotipa (467,1 dan), istočnofrizijske ovce CC i CT genotipa (434,5 dana i 428,4 dana), ličke pramenke CT i TT genotipa (473,6 dana i 414,7 dana) te paške ovce CC i TT genotipa (478,2 dana i 455,9 dana). Nadalje, dob ovaca pri prvom janjenju između 500 i 600 dana utvrđena je u šest pasmina sva tri genotipa i to: bovške ovce CT genotipa (582,7 dana), dalmatinske pramenke genotipa CC, CT i TT (571,3 dana, 553,8 dana i 587,4 dana), istarske ovce CT i TT genotipa (579,1 dan i 596,1 dan), ličke pramenke CC

genotipa (542,6 dana), paške ovce CT genotipa (515,4 dana) te Suffolk pasmine CC i CT genotipa (550,9 dana i 519,1 dan). Naposljetku, dob ovaca pri prvom janjenju iznad 600 dana utvrđena je u tri pasmine i to: bovške ovce CC i TT genotipa (616,7 dana i 660 dana), istarske ovce CC genotipa (626,7 dana) i Suffolk pasmine TT genotipa (686,6 dana).

U grafikonu 23. prikazana je prosječna dob ovaca prilikom prvog janjenja po pasminama s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena.



Grafikon 23. Dob ovaca pri prvom janjenju po pasminama s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena

Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 606 MTNR1A gena prikazan je u tablici 30. Prisutnost polimorfizma na poziciji 612, odnosno genotip GG, u većine istraživanih pasmina pozitivno je utjecao na dob ovaca pri prvom janjenju. Pozitivan utjecaj utvrđen je u populacijama cigaje, dalmatinske pramenke, istočnofrizijske ovce, ličke pramenke i romanovske ovce. U tri istraživane pasmine (bovške ovce, paške ovce i Suffolk) najpovoljniji utjecaj na dob pri prvom janjenju imao je genotip AA, dok je u dubrovačke rude i istarske ovce na navedeno svojstvo najpovoljnije utjecao genotip GA (tablica 30.).

Nesrazmjer između utvrđenih genotipova na lokusu 612 MTNR1A gena pojedinih pasmina s obzirom na dob pri prvom janjenju zasigurno je posljedica neravnomjerne raspodjele alela u pojedinih pasmina. Potrebo je istaknuti da je u bovške ovce, paške ovce, romanovske ovce i Suffolka na dob pri prvom janjenju najpovoljnije djelovao genotip utvrđen samo u tri, dvije i četiri jedinke, što nije reprezentativan podatak.

Kao i u slučaju genotipova na lokusu 606, dob pri prvom janjenju između genotipova na lokusu 612 istraživanih pasmina ovaca uvelike se razlikovala. Interesantno

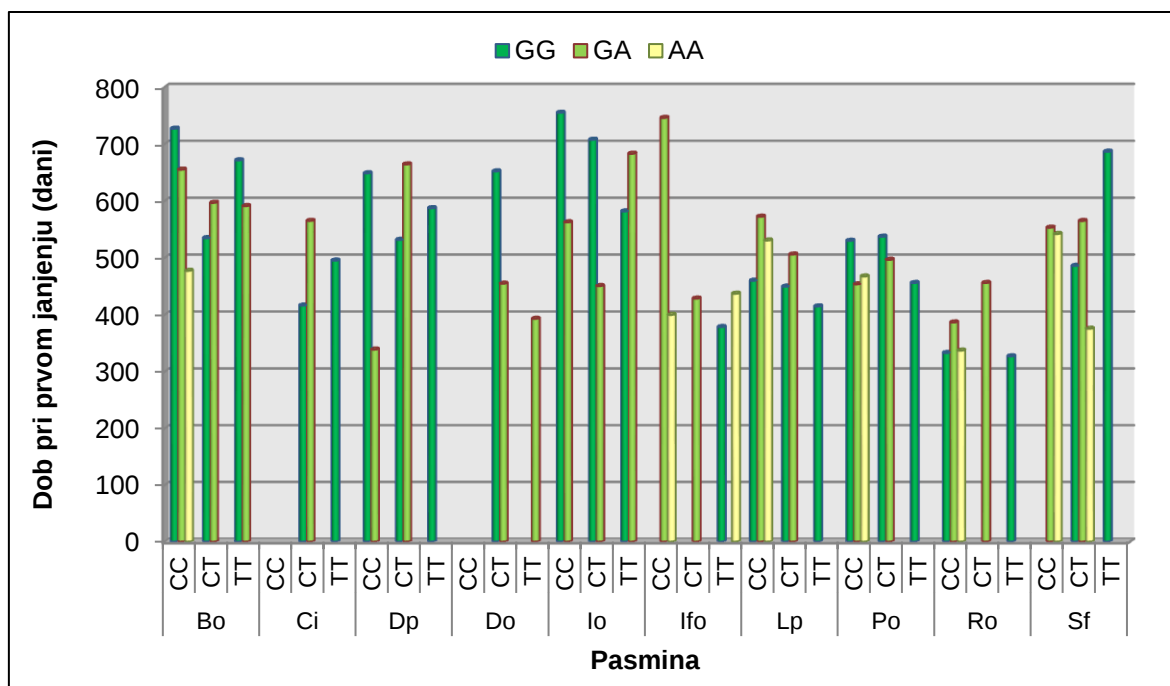
je da su se od svih pasmina obuhvaćenih predmetnim istraživanjem u najranijoj dobi janjile jedinice romanovske ovce GG genotipa s dobi od 330 dana, dok su pri prvom janjenju najstarije bile ovce Suffolk pasmine sa 653,2 dana također genotipa GG. Tako su se u dobi ispod 400 dana uz romanovsku ovcu genotipa GG janjile i istočnofrizijske ovce (378,6 dana). U dobi od 400 do 500 dana po prvi puta se janjio najveći broj pasmina, njih šest, različitog genotipa kako slijedi: genotipa GG lička pramenka (431,9 dana) i cigaja (479,4 dana), genotipa GA dubrovačka ovca (447,5 dana), a genotipa AA Suffolk (458,8 dana), paška ovca (467,3 dana) i bovška ovca (477,3 dana). Nadalje, s dobi iznad 500 dana prvi put su se janjile jedinice GG genotipa dalmatinske pramenke (568,8 dana) i jedinice GA genotipa istarske ovce (507,6 dana).

Tablica 30. Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 606 MTNR1A gena

Pasmina	L 612	n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
Bovška ovca	GG	20	626,4	162,4	350,0	762,0
	GA	34	610,1	169,2	341,0	780,0
	AA	3	477,3	222,9	324,0	733,0
Cigaja	GG	20	479,4	126,2	312,0	776,0
	GA	5	565,0	53,9	509,0	629,0
	AA	-	-	-	-	-
Dalmatinska pramenka	GG	35	568,8	160,1	354,0	806,0
	GA	4	583,0	233,6	339,0	798,0
	AA	-	-	ne	-	-
Dubrovačka ovca	GG	1	652,0	-	652,0	652,0
	GA	17	447,5	69,1	347,0	622,0
	AA	-	-	-	-	-
Istarska ovca	GG	12	648,6	149,1	430,0	805,0
	GA	8	507,6	117,1	422,0	703,0
	AA	-	-	-	-	-
Istočnofrizijska ovca	GG	9	378,6	24,8	337,0	411,0
	GA	17	447,1	136,5	343,0	749,0
	AA	10	403,6	26,7	369,0	458,0
Lička pramenka	GG	27	431,9	64,0	325,0	714,0
	GA	13	526,2	152,9	358,0	751,0
	AA	3	530,7	189,9	404,0	749,0
Paška ovca	GG	30	498,5	127,8	360,0	825,0
	GA	20	485,9	119,7	357,0	751,0
	AA	3	467,3	45,9	417,0	507,0
Romanovska ovca	GG	2	330,0	4,2	327,0	333,0
	GA	7	416,3	213,1	228,0	815,0
	AA	3	337,0	16,1	320,0	352,0
Suffolk	GG	6	653,2	167,1	398,0	782,0
	GA	15	558,6	182,9	352,0	781,0
	AA	4	458,8	171,5	368,0	716,0

n – utvrđen broj genotipova; $\bar{x}$ – prosječna vrijednost; Sd – standardna devijacija; Min – najmanja vrijednost; Maks – najveća vrijednost.

Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena prikazan je u grafikonu 24. i tablici 31.



Grafikon 24. Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

U tablici 31. prikazana je dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena. Od svih istraživanih pasmina ovaca najranije su se janjile jedinice romanovske ovce kombinacije genotipa TT/GG (606/612) s dobi od 327,0 dana. Navedena kombinacija genotipova povoljno je utjecala na dob pri prvom janjenju u istočnofrizijske ovce (378,6 dana) i ličke pramenke (414,7 dana). U ostalih pasmina kao najpovoljnije kombinacije genotipova bile su: CC/AA (606/612) u bovške ovce (477,3 dana), CT/GG (606/612) u cigaje (416,3 dana), CC/GA (606/612) u dalmatinske pramenke (339,0 dana) i paške ovce (453,6 dana), CT/GA (606/612) u dubrovačke ovce (430,3 dana) i istarske ovce (450,6 dana) te CT/AA (606/612) u Suffolk pasmine (375,5 dana).

Tablica 31. Dob ovaca pri prvom janjenju s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

Pasmina	L 606	L 612	n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
Bovška ovca	CC	GG	1	727,0	-	727,0	727,0
		GA	8	655,1	164,3	365,0	780,0
		AA	3	477,3	222,9	324,0	733,0
	CT	GG	7	534,7	189,4	350,0	762,0
		GA	24	596,7	172,0	341,0	747,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	12	671,5	132,4	384,0	751,0
		GA	2	591,0	231,9	427,0	755,0
		AA	-	-	-	-	-
Cigaja	CC	GG	-	-	-	-	-
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
	CT	GG	4	416,3	53,6	337,0	450,0
		GA	5	565,0	53,9	509,0	629,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	16	495,2	135,2	312,0	776,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
Dalmatinska pramenka	CC	GG	3	648,7	157,4	467,0	743,0
		GA	1	339,0	-	339,0	339,0
		AA	-	-	-	-	-
	CT	GG	15	531,7	146,2	401,0	787,0
		GA	3	664,3	205,3	428,0	798,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	17	587,4	172,6	354,0	806,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
Dubrovačka ovca	CC	GG	-	-	-	-	-
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
	CT	GG	1	652,0	-	652,0	652,0
		GA	15	454,7	70,6	347,0	622,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	-	-	-	-	-
		GA	2	393,0	2,8	391,0	395,0
		AA	-	-	-	-	-
Istarska ovca	CC	GG	1	755,0	-	755,0	755,0
		GA	2	562,5	198,7	422,0	703,0
		AA	-	-	-	-	-
	CT	GG	5	707,6	135,2	474,0	805,0
		GA	5	450,6	29,2	428,0	492,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	6	581,7	152,1	430,0	734,0
		GA	1	683,0	-	683,0	683,0
		AA	-	-	-	-	-

Nastavak tablice 31.

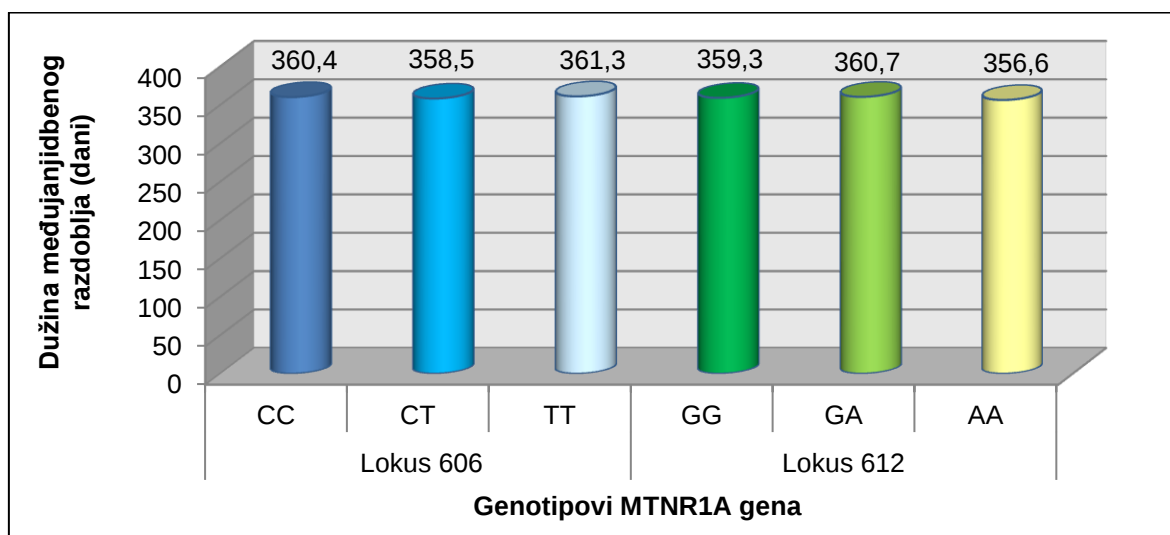
Pasmina	L 606	L 612	n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
Istočnofrizijska ovca	CC	GG	-	-	-	-	-
		GA	1	746,0	-	746,0	746,0
		AA	9	399,9	25,5	369,0	458,0
	CT	GG	-	-	-	-	-
		GA	16	428,4	116,4	343,0	749,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	9	378,6	24,8	337,0	411,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	1	437,0	-	437,0	437,0
Lička pramenka	CC	GG	1	460,0	-	460,0	460,0
		GA	4	572,3	160,7	415,0	751,0
		AA	3	530,7	189,9	404,0	749,0
	CT	GG	12	449,5	86,0	376,0	714,0
		GA	9	505,8	154,4	358,0	719,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	14	414,7	35,8	325,0	451,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
Paška ovca	CC	GG	3	530,0	9,5	520,0	539,0
		GA	5	453,6	80,8	371,0	538,0
		AA	3	467,3	45,9	417,0	507,0
	CT	GG	13	537,2	146,7	360,0	750,0
		GA	15	496,6	130,7	357,0	751,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	14	455,9	113,4	367,0	825,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
Romanovska ovca	CC	GG	1	333,0	-	333,0	333,0
		GA	4	386,5	148,6	257,0	599,0
		AA	3	337,0	16,1	320,0	352,0
	CT	GG	-	-	-	-	-
		GA	3	456,0	314,7	228,0	815,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	1	327,0	-	327,0	327,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
Suffolk	CC	GG	-	-	-	-	-
		GA	8	553,1	200,5	352,0	767,0
		AA	2	542,0	246,1	368,0	716,0
	CT	GG	1	486,0	-	486,0	486,0
		GA	7	564,9	176,3	377,0	781,0
		AA	2	375,5	2,1	374,0	377,0
	TT	GG	5	686,6	162,8	398,0	782,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-

n – utvrđen broj genotipova; $\bar{x}$ – prosječna vrijednost; Sd – standardna devijacija; Min – najmanja vrijednost; Maks – najveća vrijednost.

4.6. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja

Međujanjidbeno razdoblje je vrijeme između dva janjenja. S obzirom da između istraživanih pasmina ovaca postoje razlike u broju evidentiranih janjenja, od najmanje dva do najviše osam, postojale su razlike i u broju međujanjidbenih razdoblja (od jednog do sedam) stoga je za svaku jedinku izračunato prosječno trajanje međujanjidbenog razdoblja bez obzira na broj evidentiranih janjenja.

Prosječna dužina međujanjidbenog razdoblja s obzirom na prisutnost polimorfizma na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena prikazana je u grafikonu 25.



Grafikon 25. Dužina međujanjidbenog razdoblja ovaca s obzirom na genotip na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

Prosječne dužine međujanjidbenih razdoblja istraživanih jedinki s obzirom na prisutnost polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena prikazane su u tablici 32. Srednje vrijednosti prosječne dužine međujanjidbenog razdoblja s obzirom na polimorfizam na lokusu 606 i 612 vrlo su izjednačene i iznosile su oko godinu dana, dok su najmanje i najveće vrijednosti bile u rasponu od 262 do 539 dana. S obzirom na polimorfizam na lokusu 606 utvrđene dužine međujanjidbenog razdoblja bile su vrlo izjednačene između sva tri genotipa, a najmanju prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja imao je genotip CT (358,5 dana). Prosječna dužina međujanjidbenih razdoblja u sva tri genotipa na lokusu 612 također je bila podjednaka. Najpovoljnije djelovanje, odnosno najmanja dužina međujanjidbenog razdoblja utvrđena je u ovaca AA genotipa (356,6 dana).

Tablica 32. Opisna statistika prosječne dužine međujanjidbenog razdoblja ovaca s obzirom na polimorfizam na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

Polimorfizam		n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
606	CC	60	360,4	46,7	262,0	529,0
	CT	146	358,5	43,8	275,0	539,0
	TT	78	361,3	44,4	276,0	526,5
612	GG	136	359,3	44,8	276,0	526,5
	GA	124	360,7	45,4	270,0	539,0
	AA	24	356,6	37,8	262,0	458,0

n – utvrđen broj genotipova; $\bar{x}$ – prosječna vrijednost; Sd – standardna devijacija; Min – najmanja vrijednost; Maks – najveća vrijednost.

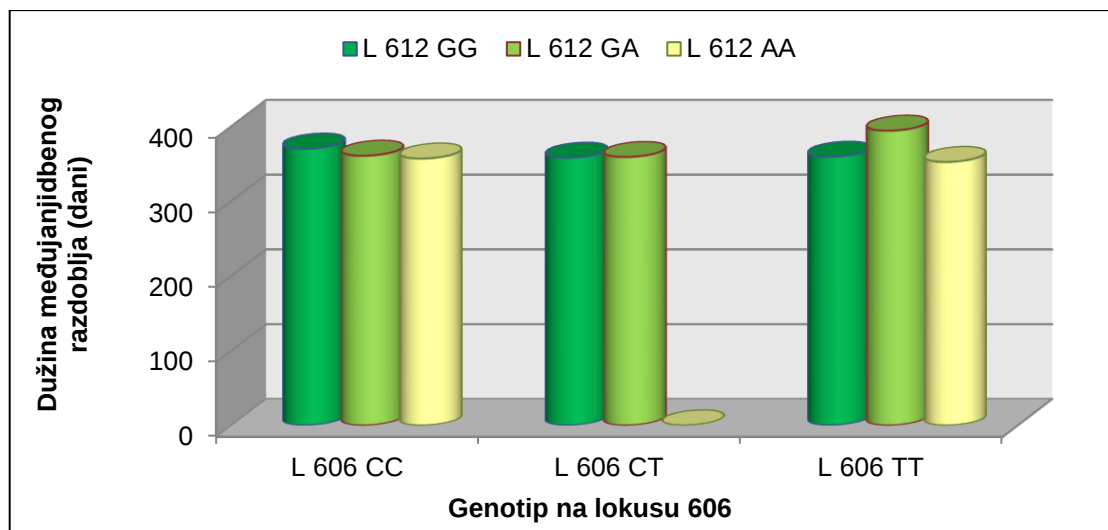
Utjecaj polimorfizma na poziciji 606 i 612 na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja prikazan je u tablici 33. Promatrajući vrijednosti zbroja najmanjih kvadrata za prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja na lokusu 606 najkraće međujanjidbeno razdoblje imale su jединke CT genotipa (363 dana), dok su na lokusu 612 najkraće razdoblje između dva janjenja imale jединke genotipa AA (360) dana. Razlike u prosječnoj dužini međujanjidbenog razdoblja između genotipova na oba istraživana lokusa nisu bile statistički značajne.

Tablica 33. Utjecaj polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja

L 606	LSMEANS ± SE	L 612	LSMEANS ± SE
CC	366,85 ± 7,52	GG	365,10 ± 6,10
CT	362,96 ± 5,78	GA	367,22 ± 5,90
TT	369,27 ± 6,44	AA	360,21 ± 10,88

LSMEANS ± SE – prosjek suma najmanjih kvadrata ± standardna greška

Dužina međujanjidbenog razdoblja s obzirom na kombinaciju polimorfizama na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena prikazana je u grafikonu 26. Od ukupno devet mogućih kombinacija genotipova na oba lokusa, utvrđeno je osam kombinacija, izuzev kombinacije CT/AA (606/612). Prosječne dužine međujanjidbenih razdoblja između utvrđenih kombinacija genotipova bile su vrlo izjednačene i kretale su se u rasponu od 352 do 370 dana, izuzev kombinacije TT/GA (606/612) u koje je prosječna dužina međujanjidbenog razdoblja iznosila 394 dana.



Grafikon 26. Dužina međujanjdbenog razdoblja ovaca s obzirom na kombinaciju genotipova na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena

S obzirom na prisutnost ili izostanak polimorfizma na lokusu 606 i lokusu 612, prosječne dužine međujanjdbenih razdoblja prikazane su u tablici 34.

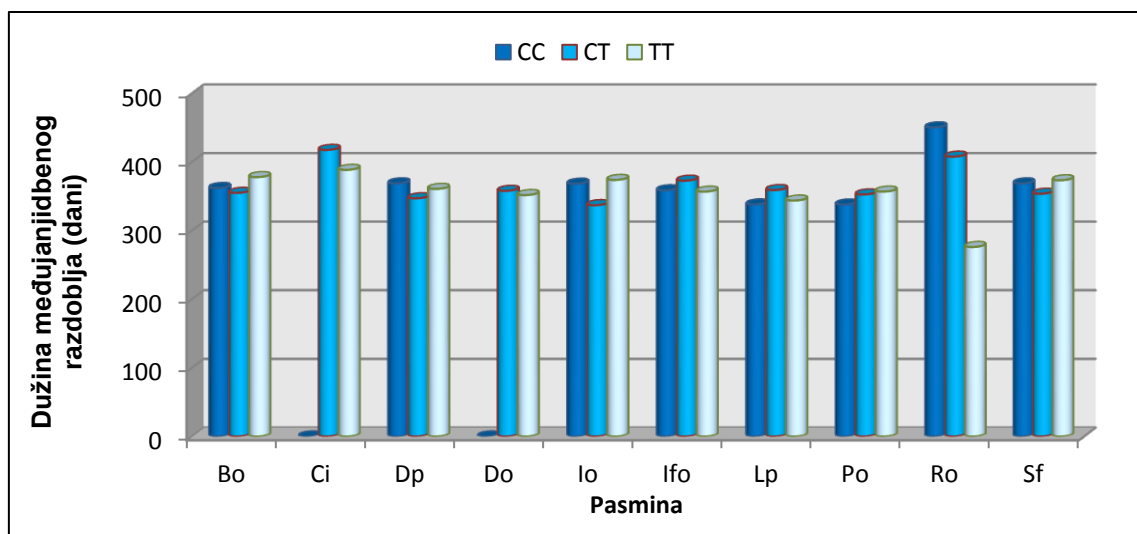
Tablica 34. Opisna statistika kombinacije polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na prosječnu dužinu međujanjdbenog razdoblja (dana)

L 606	L 612	n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
CC	GG	8	370,0	55,3	307,0	461,6
	GA	29	360,6	51,3	270,0	529,0
	AA	23	356,8	38,6	262,0	458,0
CT	GG	56	357,9	47,2	287,0	499,0
	GA	90	358,9	41,8	275,0	539,0
	AA	0	-	-	-	-
TT	GG	72	359,2	42,2	276,0	526,5
	GA	5	394,1	69,5	348,5	513,0
	AA	1	352,3	-	352,3	352,3

n – utvrđen broj genotipova; $\bar{x}$ – prosječna vrijednost; Sd – standardna devijacija; Min – najmanja vrijednost; Maks – najveća vrijednost.

Kombinacija genotipova s najkraćim međujanjdbenim razdobljem bila je TT/AA (606/612) sa 352,3 dana. Kako je navedena kombinacija utvrđena samo u jednoj jedinki, navedenu vrijednost treba uzeti s oprezom. Sljedeća kombinacija genotipova s najkraćim međujanjdbenim razdobljem bila je CT/GG (606/612) sa 357,9 dana, a raspon vrijednosti navedenog genotipa bio je između 287 i 499 dana.

Utjecaj polimorfizma na poziciji 606 na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja istraživanih pasmina ovaca prikazan je u grafikonu 27.



Grafikon 27. Dužina međujanjidbenog razdoblja ovaca s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 606 MTNR1A gena

U devet pasmina međujanjidbena razdoblja bila su izjednačena između utvrđenih genotipova na poziciji 606, osim romanovske ovce u koje se dužina međujanjidbenog razdoblja skraćivala od CC prema TT genotipu.

Opisna statistika prosječnih dužina međujanjidbenih razdoblja istraživanih pasmina s obzirom na polimorfizam lokusa 606 prikazana je u tablici 35.

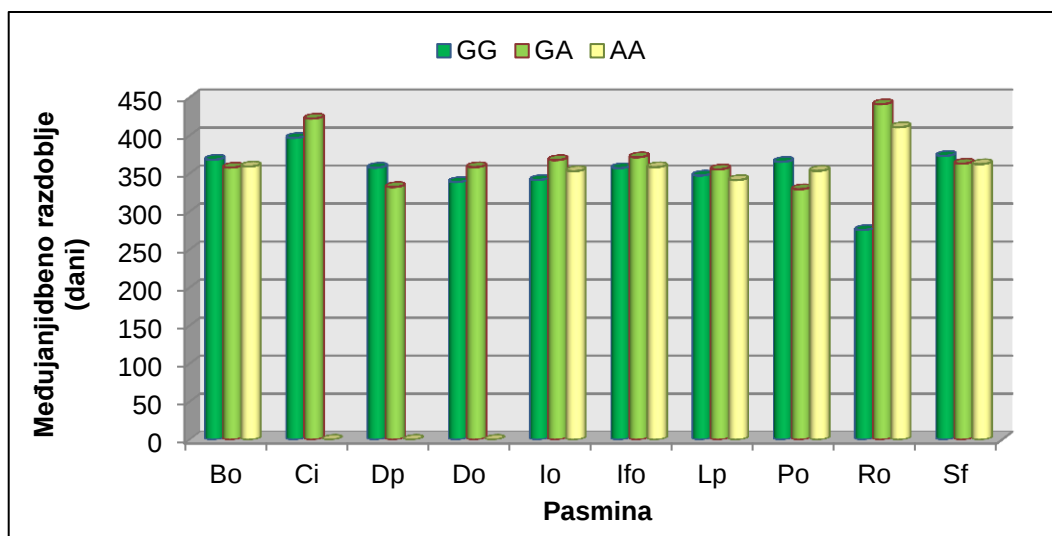
Tablica 35. Prosječne dužine međujanjidbenog razdoblja s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 606 MTNR1A gena

Pasmina	L 606	n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
Bovška ovca	CC	12	362,0	14,4	349,5	405,1
	CT	31	354,9	9,7	323,0	366,0
	TT	12	377,9	51,0	335,0	526,5
Cigaja	CC	-	-	-	-	-
	CT	7	417,6	62,9	321,0	505,5
	TT	5	388,5	25,4	365,0	426,0
Dalmatinska pramenka	CC	4	368,8	68,0	299,0	461,6
	CT	17	347,0	28,1	321,0	447,8
	TT	13	360,7	42,8	310,0	468,7
Dubrovačka ovca	CC	-	-	-	-	-
	CT	10	357,9	31,8	335,0	443,7
	TT	2	351,7	4,5	348,5	354,8
Istarska ovca	CC	4	368,3	52,0	330,7	445,0
	CT	11	337,0	17,9	310,0	366,0
	TT	6	373,8	69,2	330,5	513,0
Istočnofrizijska ovca	CC	10	358,7	31,1	326,0	443,5
	CT	15	372,7	56,0	327,7	539,0
	TT	10	356,7	8,7	335,0	366,5
Lička pramenka	CC	12	338,1	15,0	301,0	354,4
	CT	22	359,0	57,6	309,0	525,0
	TT	13	343,7	46,4	300,5	490,5
Paška ovca	CC	9	338,0	71,1	262,0	458,0
	CT	28	352,6	51,3	275,0	484,3
	TT	13	356,8	47,7	315,3	490,0
Romanovska ovca	CC	4	450,5	53,2	411,0	529,0
	CT	2	407,8	15,2	397,0	418,5
	TT	1	276,0	-	276,0	276,0
Suffolk	CC	5	368,8	13,9	352,0	387,0
	CT	3	353,7	8,8	344,0	361,2
	TT	3	373,3	11,2	361,0	383,0

n – utvrđen broj genotipova; $\bar{x}$ – prosječna vrijednost; Sd – standardna devijacija; Min – najmanja vrijednost; Maks – najveća vrijednost.

Srednje vrijednosti dužine međujanjidbenog razdoblja istraživanih pasmina kretale su se u rasponu od 276 do 450,5 dana, dok su najmanje i najveće vrijednosti međujanjidbenog razdoblja iznosile 262, odnosno, 539 dana. U paške ovce i ličke pramenke u jedinki genotipa CC utvrđeno je najkraće međujanjidbeno razdoblje od 338 dana i 338,2 dana, dok je u romanovske ovce istog genotipa utvrđeno najduže međujanjidbeno razdoblje od 450,5 dana. U istarske ovce heterozigotnog genotipa CT utvrđeno je najkraće međujanjidbeno razdoblje (337 dana), a ovce cigaje najdulje razdoblje od 417,6 dana. Najkraće, odnosno najduže međujanjidbeno razdoblje ovaca TT genotipa utvrđeno je u romanovske ovce (276 dana), odnosno u populaciji cigaje (388,5 dana).

Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na poziciji 612 na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja istraživanih pasmina prikazan je u grafikonu 28.



Grafikon 28. Dužina međujanjidbenog razdoblja ovaca s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 612 MTNR1A gena

Utvrđene vrijednosti prosječne dužine međujanjidbenog razdoblja istraživanih pasmina s obzirom na polimorfizam na poziciji 612 prikazane su u tablici 36.

Tablica 36. Prosječne dužine međujanjidbenog razdoblja s obzirom na pasminu i genotip na lokusu 612 MTNR1A gena

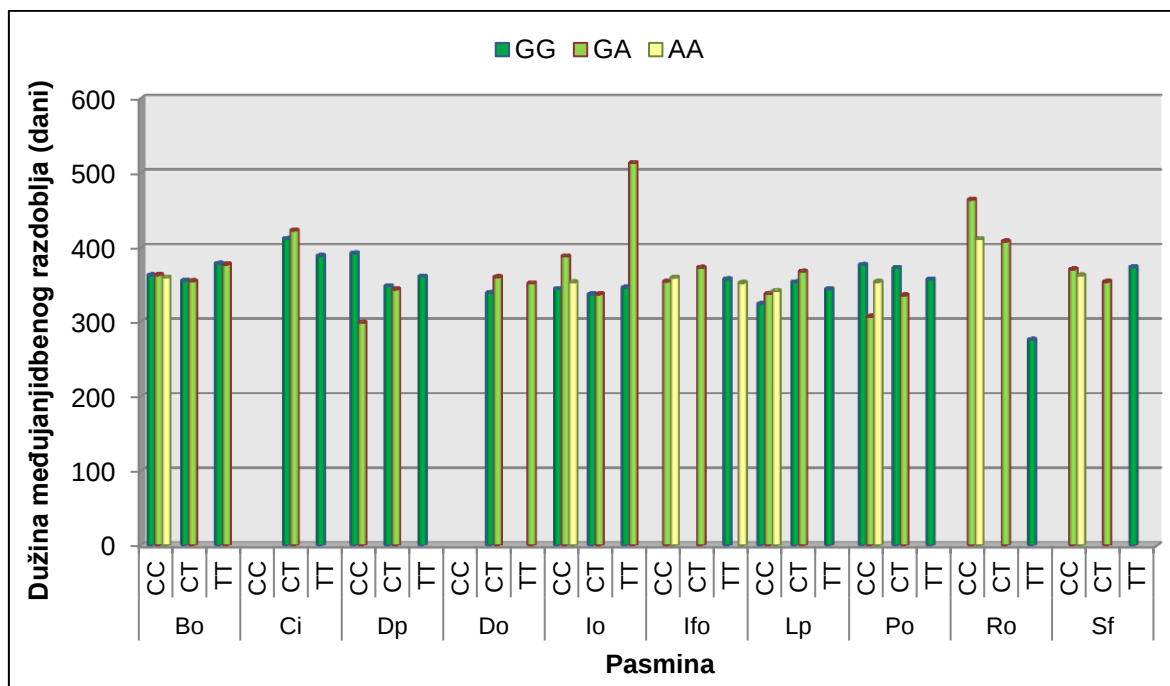
Pasmina	L 612	n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
Bovška ovca	GG	18	368,3	42,3	335,0	526,5
	GA	34	358,0	14,0	323,0	405,1
	AA	3	359,4	9,6	349,5	368,7
Cigaja	GG	8	397,0	47,7	321,0	465,3
	GA	4	422,4	60,9	364,0	505,5
	AA	-	-	-	-	-
Dalmatinska pramenka	GG	30	357,8	40,2	310,0	468,7
	GA	4	332,4	22,5	299,0	347,0
	AA	-	-	-	-	-
Dubrovačka ovca	GG	1	339,0	-	339,0	339,0
	GA	11	358,5	29,7	335,0	443,7
	AA	-	-	-	-	-
Istarska ovca	GG	11	341,7	16,0	310,0	364,0
	GA	9	367,8	66,8	315,0	513,0
	AA	1	353,3	-	353,3	353,3
Istočnofrizijska ovca	GG	9	357,2	9,1	335,0	366,5
	GA	16	371,5	54,3	327,7	539,0
	AA	10	358,5	31,1	326,0	443,5
Lička pramenka	GG	27	347,5	48,4	300,5	499,0
	GA	15	355,6	53,2	301,0	525,0
	AA	5	341,5	7,5	330,2	351,3
Paška ovca	GG	28	365,5	55,9	287,0	490,0
	GA	19	329,5	35,2	270,0	410,0
	AA	3	353,6	98,6	262,0	458,0
Romanovska ovca	GG	1	276,0	-	276,0	276,0
	GA	5	441,3	51,0	397,0	529,0
	AA	1	411,0	-	411,0	411,0
Suffolk	GG	3	373,3	11,2	361,0	383,0
	GA	7	363,2	15,0	344,0	387,0
	AA	1	362,4	-	362,4	362,4

n – utvrđen broj genotipova; $\bar{x}$ – prosječna vrijednost; Sd – standardna devijacija; Min – najmanja vrijednost; Maks – najveća vrijednost.

S obzirom na polimorfizam na lokusu 612 najkraće međujanjidbeno razdoblje ovaca genotipa GG utvrđeno je u romanovske ovce (276 dana), genotipa GA u paške ovce (329,5 dana), a genotipa AA u ličke pramenke (341,7 dana). Iako u istraživanim pasminama postoje određena odstupanja u dužini međujanjidbenih razdoblja s obzirom na genotip na lokusu 612 MTNR1A gena, u većine pasmina najkraće međujanjidbeno razdoblje utvrđeno je u jedinki genotipa GG. Od istraživanih pasmina u slijedećih pasmine ovaca genotipa GG utvrđeno je najkraće međujanjidbeno razdoblje: cigaja (397 dana), dubrovačka ovca (339 dana), istarska ovca (341,7 dana), istočnofrizijska ovca (357,2 dana) i romanovska ovca (276 dana). U bovške ovce, dalmatinske pramenke i paške ovce genotipa GA utvrđeno je najkraće međujanjidbeno razdoblje kako slijedi: 358, 332,4 i

329,5 dana. Međutim, u jedinki genotipa AA ličke pramenke i Suffolka utvrđeno je najkraće međujanjdbeno razdoblje s prosječnim vrijednostima od 341,7 i 362,4 dana.

Utjecaj kombinacije polimorfizama MTNR1A gena na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena na prosječnu dužinu međujanjdbenog razdoblja prikazan je u grafikonu 29.



Grafikon 29. Prosječna dužina međujanjdbenog razdoblja ovaca s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

U tablici 37. prikazana je prosječna dužina međujanjdbenog razdoblja s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i 612 MTNR1A gena.

Tablica 37. Prosječna dužina međujanjidbenog razdoblja s obzirom na pasminu i kombinaciju genotipa na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

Pasmina	L 606	L 612	n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
Bovška ovca	CC	GG	1	362,5	-	362,5	362,5
		GA	8	362,9	17,2	353,0	405,1
		AA	3	359,4	9,6	349,5	368,7
	CT	GG	7	355,2	10,0	335,0	366,0
		GA	24	354,7	9,9	323,0	363,8
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	10	378,0	55,4	335,0	526,5
		GA	2	377,0	31,7	354,7	399,4
		AA	-	-	-	-	-
Cigaja	CC	GG	-	-	-	-	-
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
	CT	GG	3	411,3	78,7	321,0	465,3
		GA	4	422,4	60,9	364,0	505,5
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	5	388,5	25,4	365,0	426,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
Dalmatinska pramenka	CC	GG	3	392,0	60,7	350,0	461,6
		GA	1	299,0	-	299,0	299,0
		AA	-	-	-	-	-
	CT	GG	14	347,7	31,1	321,0	447,8
		GA	3	343,5	4,3	338,8	347,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	13	360,7	42,8	310,0	468,7
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
Dubrovačka ovca	CC	GG	-	-	-	-	-
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
	CT	GG	1	339,0	-	339,0	339,0
		GA	9	360,0	33,0	335,0	443,7
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	-	-	-	-	-
		GA	2	351,7	4,5	348,5	354,8
		AA	-	-	-	-	-
Istarska ovca	CC	GG	1	344,0	-	344,0	344,0
		GA	2	387,8	80,8	330,7	445,0
		AA	1	353,3	-	353,3	353,3
	CT	GG	5	337,0	20,3	310,0	360,0
		GA	6	337,0	17,6	315,0	366,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	5	346,0	13,2	330,5	364,0
		GA	1	513,0	-	513,0	513,0
		AA	-	-	-	-	-

Nastavak tablice 37.

Pasmina	L 606	L 612	n	$\bar{x}$	Sd	Min	Maks
Istočnofrizijska ovca	CC	GG	-	-	-	-	-
		GA	1	354,0	-	354,0	354,0
		AA	9	359,2	32,9	326,0	443,5
	CT	GG	-	-	-	-	-
		GA	15	372,7	56,0	327,7	539,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	9	357,2	9,1	335,0	366,5
		GA	-	-	-	-	-
		AA	1	352,3	-	352,3	352,3
Lička pramenka	CC	GG	1	324,0	-	324,0	324,0
		GA	6	337,7	19,9	301,0	354,4
		AA	5	341,5	7,5	330,2	351,3
	CT	GG	13	353,2	53,2	309,0	499,0
		GA	9	367,5	65,6	322,5	525,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	13	343,7	46,4	300,5	490,5
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
Paška ovca	CC	GG	2	376,5	98,3	307,0	446,0
		GA	4	307,1	35,4	270,0	355,3
		AA	3	353,6	98,6	262,0	458,0
	CT	GG	13	372,4	61,6	287,0	484,3
		GA	15	335,5	33,8	275,0	410,0
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	13	356,8	47,7	315,3	490,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
Romanovska ovca	CC	GG	-	-	-	-	-
		GA	3	463,7	56,6	430,0	529,0
		AA	1	411,0	-	411,0	411,0
	CT	GG	-	-	-	-	-
		GA	2	407,8	15,2	397,0	418,5
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	1	276,0	-	276,0	276,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-
Suffolk	CC	GG	-	-	-	-	-
		GA	4	370,4	15,5	352,0	387,0
		AA	1	362,4	-	362,4	362,4
	CT	GG	-	-	-	-	-
		GA	3	353,7	8,8	344,0	361,2
		AA	-	-	-	-	-
	TT	GG	3	373,3	11,2	361,0	383,0
		GA	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-

n – utvrđen broj genotipova; $\bar{x}$ – prosječna vrijednost; Sd – standardna devijacija; Min – najmanja vrijednost; Maks – najveća vrijednost.

Od svih istraživanih pasmina ovaca najkraće međujanjidbeno razdoblje utvrđeno je u jedinki romanovske ovce kombinacije genotipa TT/GG (606/612) od 276 dana. Navedena kombinacija genotipova povoljno je utjecala na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja još u cigaje (388,5 dana). U ostalih pasmina kao najpovoljnije kombinacije genotipova bile su: CT/GA (606/612) u bovške ovce (354,7 dana), istarske ovce (337 dana) i Suffolka (353,7 dana), zatim kombinacija CC/GA (606/612) u dalmatinske pramenka (299 dana) i ličke pramenke (324,0 dana), kombinacija CT/GG (606/612) u dibrovačke ovce (339 dana) i istarske ovce (337 dana) te kombinacija TT/AA (606/612) u istočnofrizijske ovce (352,3 dana) i kombinacija CC/GA (606/612) u paške ovce (307,1 dan).

5. RASPRAVA

Ovce, jedna od najranije pripitomljenih i najrasprostranjenijih životinjskih vrsta, od svih domaćih životinja daju najveći broj proizvoda. Međutim, u intenzivnim sustavima proizvodnje mesa nisu proizvodno učinkovite kao, primjerice goveda i svinje. S obzirom da reprodukcija čini temelj stočarske proizvodnje, sezonska reprodukcijska aktivnost ovaca jedan je od najvažnijih čimbenika koji ograničava veću zastupljenost ovaca u intenzivnim proizvodnim sustavima. Trajanje osvjetljenja utječe na sekreciju hormona melatonina koji je odgovoran za pokretanje spolnog ciklusa u ovaca. S obzirom da melatonin djeluje putem receptora, a gen koji kodira ovčji MT1 receptor (MTNR1A gen) dobar je kandidat gen za unapređenje izvansezonske reprodukcije ovaca. Detekcija poželjnih alela na drugom egzonu MTNR1A gena omogućila bi odabir poželjnih genotipova i stvaranje populacija sa cjelogodišnjom estrusnom aktivnosti.

Sezonska poliestričnost ovaca najizraženija je u pasmina s područja umjerenog klimatskog pojasa, kojem pripadaju i hrvatske autohtone pasmine koje čine temelj hrvatskog ovčarstva. Upravo izrazita sezonalnost pasmina ovaca uzgajanih u Hrvatskoj bila je presudni čimbenik u definiranju ciljeva i izradi ove doktorske disertacije. Detekcija poželjnih genotipova uz poboljšanje paragenetskih čimbenika zasigurno može pridonijeti smanjenju reprodukcijske sezonalnosti ovaca, a samim time i povećanju intenziteta ovčarske proizvodnje.

5.1. Distribucija sezona janjenja pojedinih pasmina ovaca

U istraživanom uzorku 10 različitih pasmina ovaca obuhvaćenih predmetnim istraživanjem evidentirana su janjenja u sve četiri sezone. S obzirom da je većina pasmina ovaca, kao i onih obuhvaćenih predmetnim istraživanjima po pitanju reprodukcije sezonski poliestrična najveći broj janjenja je utvrđen zimi i u proljeće (gotovo 90%), što je uobičajeno za područje umjerenog klimatskog pojasa. Međutim, bez obzira jeli neka pasmina pripada poliestričnim, odnosno, da ju odlikuje pojava estrusa tijekom cijele godine ili je sezonski poliestrična (tjera se samo u određenoj sezoni), na distribuciju njenih janjenja uvelike utječe namjena pasmine i tehnologija proizvodnje. Tako je u istočnofrizijske ovce, koju odlikuje produljeno razdoblje pripusne sezone, evidentirano više od 90% janjenja tijekom zime, dok je ostatak janjenja evidentiran u proljeće. Nasuprot navedenom, u cigaje, koju se smatra kao i ostale hrvatske autohtone pasmine ovaca, sezonski tipičnom poliestričnom pasminom, evidentirana su janjenja u sve četiri sezone.

Podjednaka distribucija janjenja je utvrđena i u paške ovce, s tim da je u navedene pasmine glavnina janjenja (67%) evidentirana tijekom zime. Distribucija janjenja u cigaje kroz cijelu godinu i u istočnofrizijske ovce tijekom zime i proljeća posljedica je tehnologije uzgoja i proizvodnog cilja koji je u cigaje meso, a u istočnofrizijske ovce mlijeko. U proizvodnji mesa cilj je osigurati što ravnomjerniju distribuciju janjenja tijekom cijele godine koja omogućuje cjelogodišnji prihod uzgajivačima od prodaje janjadi i ravnomjerniju ponudu janječeg mesa na tržištu koja tada postiže bolju cijenu. U proizvodnji mlijeka koje otkupljuje mliječna industrija tehnološki proces potrebno je prilagoditi terminima otkupa koji traju od ožujka do listopada. Za istočnofrizijsku ovcu se može tvrditi da je njena distribucija janjenja pod izrazitim utjecajem tehnološkog procesa proizvodnje s obzirom da se u literaturi navodi da je pasmina koja ima kontinuirani spolni ciklus tijekom pet mjeseci (Ward i Williams, 1993) što zasigurno omogućuje ravnomjerniju distribuciju janjenja tijekom godine. Distribucija janjenja utvrđena predmetnim istraživanjem u cigaje i istočnofrizijske ovce u suglasju je s podacima Hrvatske poljoprivredne agencije (HPA, 2016) u kojima su evidentirana janjenja tijekom cijele godine u populaciji cigaje, dok se u populaciji istočnofrizijske ovce više od 75% ovaca ojanji tijekom zimskog razdoblja. Utjecaj tehnologije uzgoja na distribuciju janjenja ovaca obuhvaćenih predmetnim istraživanjem također je zamjetan i u ostalih pasmina. Tako se bovška ovca janji zimi (35%) i u proljeće (64%) te nakon kopnjenja snijega ovce odlaze na planinske pašnjake u okolici doline Trente u području nacionalnog parka Triglav (Bojkovski i sur., 2014). Stoga do odlaska na planinske pašnjake janjad treba dovoljno stasati da se probavi sustav stigne prilagoditi na konzumaciju svježe voluminozne krme kako bi mogla pratiti odrasle ovce tijekom razdoblja ispaše. Nakon odbića janjadi, na planinama se provodi tradicijska mužnja ovaca, a mlijeko se prerađuje u sir i skutu (Bojkovski i sur., 2014). Jedinke dalmatinske pramenke obuhvaćene predmetnim istraživanjima, osim za proizvodnju mesa, koriste se i za proizvodnju mlijeka. S obzirom da gospodarstvo iz kojeg su dobiveni uzorci predaje mlijeko mliječnoj industriji, glavnina janjenja kao i u istočnofrizijske ovce bila je zimi (62%), dok se manji broj ovaca janjio u proljeće (37%). Dobiveni rezultati suglasni su s podacima HPA (2016) iz kojih je razvidno da se tijekom zimskih mjeseci ojanji više od 85% ovaca dalmatinske pramenke. U dubrovačke ovce i istarske ovce zamjetno je da se manji dio ovaca (10-12%) ojanjio tijekom jeseni, dok ih se glavnina ojanjila zimi (73% i 81%) što indicira ranije tjeranje i pripust određenog broja ovaca. Slične distribucije janjenja uočene su u ličke pramenke i paške ovce, premda se radi o pasminama različitog proizvodnog cilja. Naime, glavnina janjenja navedenih pasmina evidentirana je tijekom zime (67%), znatno manje u jesen (20%, odnosno 17%), dok se u proljeće ojanjilo oko 12% ovaca obiju pasmina.

Tehnologija uzgoja koja favorizira raniji pripust rezultira i ranijim janjenjem ovaca koje počinje u jesen, što nije svojstveno pasminama izražene sezonske poliestričnosti. Kao što je i očekivano, u romanovske ovce su evidentirana janjenja u sve četiri istraživane sezone s nešto većim udjelom janjenja u proljeće (36,36%), a najmanjim u jesen (13,64%), dok je u preostale dvije sezone evidentirano oko 25% janjenja. Poznato je da romanovsku ovcu u Rusiji karakterizira produžena pripusna sezona (od kolovoza do ožujka) međutim, u mnogih jedinki navedene pasmine nije utvrđeno razdoblje anestrusa, odnosno spolnog mirovanja (Fahmy, 1996). U Hrvatskoj, prema podacima HPA (2016) za romanovsku ovcu utvrđena su janjenja u svim mjesecima tijekom godine s najvećim udjelom janjenja tijekom veljače i ožujka (oko 40%). Premda Suffolk pasminu odlikuje produženo razdoblje reproduktivske aktivnosti u odnosu na sezonski poliestrične pasmine, glavnina evidentiranih janjenja bila je zimi (88%), dok je u proljeće i jesen utvrđeno svega nekoliko janjenja. Ovi rezultati razlikuju se od navoda HPA (2016) za Suffolk populaciju iz kojih je razvidno da se 55% ovaca janji u ožujku, a čak 26% u travnju, dok tijekom ljeta i jeseni nije bilo evidentiranih janjenja.

Različita namjena i tehnologije uzgoja ovaca često mogu ograničiti vrijeme janjenja na određene sezone. Ukoliko se ovce ne pripuštaju u vrijeme kada se počinju tjerati već kad će pripust rezultirati janjenjem ovaca u najpovoljnijoj sezoni za uzgajivača, ne može se pouzdano utvrditi sezona pojave estrusa. Iako je uzgoj pasmina obuhvaćenih u predmetno istraživanje podređen tehnološkom procesu proizvodnje, u četiri pasmine (romanovska ovca, bovška ovca, cigaja i paška ovca) evidentirana su janjenja i tijekom ljeta, dok su u sedam istraživanih pasmina, izuzev bovške ovce i istočnofrizijske ovce evidentirana janjenja i u jesen. Dobiveni rezultati dokazuju mogućnost janjenja, a samim time i pojave estrusa (tjeranja), ponajprije sezonski poliestričnih pasmina ovaca i izvan uobičajene sezone karakteristične za područje umjerenog klimatskog pojasa. Svakako su potrebna daljnja istraživanja koja bi obuhvatila veći broj uzoraka pojedinih pasmina ovaca te na taj način omogućila precizniju procjenu distribucije janjenja po mjesecima istih.

5.2. Frekvencije alela i genotipova MTNR1A gena

Rezultati predmetnog istraživanja potvrđuju prisutnost polimorfnih lokusa na pozicijama 606 i 612 MTNR1A gena u muflona, sezonski poliestričnih pasmina ovaca (bovška ovca, cigaja, dalmatinska pramenka, dubrovačka ovca, istarska ovca, lička pramenka i paška ovca) te poliestrične pasmine (romanovska ovca) i pasmina koje odlikuje produženo razdoblje pripusne sezone (istočnofrizijska ovca i Suffolk). Prisutnost

polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena u različitim pasmina ovaca utvrdilo je više autora (Pelletier i sur., 2000; Chu i sur., 2003; Notter i sur., 2003; Chu i sur., 2006; Carcangiu i sur., 2009; 2010; Mateescu i sur., 2009; Mura i sur., 2010; Martínez-Royo i sur., 2012; Sexena i sur., 2014; Sexena i sur., 2015; Držaić i sur., 2016). Veće frekvencije T alela u odnosu na alel C na lokusu 606 MTNR1A gena utvrđene su u sezonski poliestričnih pasmina ovaca (bovška ovca, cigaja, dalmatinska pramenka, dubrovačka ovca, istarska ovca, lička pramenka i paška ovca), dok su veće frekvencije C alela na navedenom lokusu utvrđene u muflona, romanovske ovce i Suffolka, a u istočnofrizijske ovce frekvencije navedenih alela bile su izjednačene (tablica 13.). Promatrajući frekvencije alela sezonski poliestričnih pasmina ovaca obuhvaćenih predmetnim istraživanjem vidljiva je velika sličnost u frekvencijama C i T alela. Stoga pomalo iznenađuje sličnost frekvencija navedenih alela između muflona i romanovske ovce, s obzirom da je muflon izrazito sezonski poliestričan, dok romanovska ovca ima izražen spolni ciklus tijekom cijele godine. Velika sličnost u distribuciji navedenih alela MTNR1A gena između muflona i romanovske ovce zasigurno je posljedica njihove genetske sličnosti na osnovu polimorfizma krvnih grupa (Lazovskii, 1983; cit. Fahmy, 1996). Utvrđena distribucija alela na lokusu 606 MTNR1A gena slična je rezultatima Chu i sur. (2006), koji su utvrdili veće frekvencije C i G alela u poliestričnih kineskih pasmina (Small Tail Han i Hu pasmine) u odnosu na sezonski poliestrične pasmine ovaca (Suffolk, Dorset i German Mutton Merino). Carcangiu i sur. (2009) u Sarda pasmine utvrdili su veće frekvencije alela C (0,66) u odnosu na alel T (0,34). Saxena i sur. (2014) u indijske Chokla pasmine navode veće frekvencije C u odnosu na T alel (0,87 : 0,13) na lokusu 606 MTNR1A gena. Značajno veće frekvencije T alela u pasmina Sandyno i Nilgiri subumjerenog klimatskog pojasa u odnosu na Malpura i Patanwadi suptropske pasmine ovaca u Indiji utvrdili su Saxena i sur. (2015). Nasuprot navedenom, Mateescu i sur. (2009) u Dorset pasmine su utvrdili znatno veće frekvencije T alela u odnosu na C alel (0,65; 0,35).

U sezonski poliestričnih pasmina ovaca na lokusu 612 MTNR1A gena utvrđene su veće frekvencije alela G u odnosu na alel A. U istočnofrizijske ovce, romanovske ovce i Suffolka utvrđene su podjednake frekvencije G i A alela, dok su u muflona utvrđene veće frekvencije alela A (tablica 14.). Navedeno je donekle sukladno s rezultatima Chu i sur. (2006) koji su u poliestričnih, ali i u sezonski poliestričnih pasmina ovaca utvrdili veće frekvencije G u odnosu na A alel. Veću frekvenciju alela G u odnosu na alel A na lokusu 612 MTNR1A gena utvrdili su Chu i sur. (2003; 2006) u Small Tail Han pasmine ovaca, Chu i sur. (2006) u Hu, Suffolk, Dorset i German Mutton Merino ovce, Kaczor i sur. (2006) u pasmine Olkuska, poljske planinske ovce i Suffolka, Carcangiu i sur. (2009, 2011) u

pasmine Sarda, Šeker i sur. (2011) u Awassi, bijela Karaman i Chios pasmine, Martínez-Royo i sur. (2012) u Rasa Aragonesa pasmine, Saxena i sur. (2014) u Chokla pasmine, Saxena i sur. (2015) u Malpura, Patanwadi, Sandyno i Nilgiri pasmine, Luridiana i sur. (2015) u Sarda pasmine te Držaić i sur. (2016) u ovaca travničke pramenke.

Notter i Cockett (2005) pretpostavili su da je alel G mutant s obzirom da ovce koje ga nose odlikuje smanjena reproduksijska sezonalnost. Štoviše, divlja ovca (*Ovis Gmelini Musimon*) ima višu frekvenciju alela A koji je povezan s reproduksijskom aktivnošću pod utjecajem fotoperioda što potvrđuje da se navedeni alel može smatrati ancestralnim (Carcangiu i sur., 2010).

U gotovo svih istraživanih pasmina ovaca na lokusu 606 MTNR1A gena utvrđena je prisutnost sva tri genotipa (CC, CT i TT) izuzev cigaje i dubrovačke ovce u kojih nije utvrđen genotip CC te muflona u kojeg nije utvrđen genotip TT (tablica 13.). U većine pasmina ovaca obuhvaćenih predmetnim istraživanjem, od sva tri genotipa utvrđena na lokusu 606 MTNR1A gena najveće frekvencije utvrđene su za genotip CT, dok je u cigaje i istarske ovce najfrekventniji genotip bio AA, a u muflona i romanovske ovce genotip CC (tablica 13.). Zbog lokalne važnosti većine pasmina obuhvaćenih predmetnim istraživanjem usporedba s rezultatima drugih autora donekle je otežana s obzirom da se radi o različitim, često visokoselekcioniranim pasminama ovaca. Frekvencije genotipova na lokusu 606 MTNR1A gena bile su različite u različitim pasmina ovaca, dok su rezultati autora koji su istraživali istu pasminu vrlo dosljedni. U različitim pasmina ovaca frekvencije genotipova na lokusu 606 MTNR1A gena uvelike se razlikuju pa tako Chu i sur. (2006) u kineskih poliestričnih pasmina ovaca (Small Tail Han i Hu) kao najfrekventniji navode genotip CT (0,50), genotip CC (0,46 i 0,41) te genotip TT (0,04 i 0,11), dok je u sezonski poliestričnih pasmina (Suffolk, Dorset i German Mutton Merino) također najfrekventniji genotip bio CT (0,75; 0,70 i 0,48), zatim genotip TT (0,21; 0,17 i 0,28) te genotip CC (0,04; 0,13 i 0,24). U Sarda pasmine frekvencije CC genotipa bile su 0,53, genotipa CT 0,26 i genotipa TT 0,21 (Carcangiu i sur., 2009), što potvrđuju Mura i sur. (2010) navodeći vrlo slične frekvencije navedenih genotipova u Sarda pasmine (CC 0,53; CT 0,30 i TT 0,17). Sličnu distribuciju genotipova na lokusu 606 MTNR1A gena utvrdili su Saxena i sur. (2014) u Chokla pasmine (CC 0,76; CT 0,23 i TT 0,02). Frekvencije CC genotipova u pasmina subumjerenog klimatskog pojasa (Sandyno i Nilgiri) bile su 0,87 i 0,52, genotip CT 0,12 i 0,25, a genotipa TT 0,01 i 0,03, dok su u suptropskih pasmina ovaca (Malpura i Patanwadi) frekvencije genotipa CC bile 0,21 i 0,31, genotipa CT 0,50 i 0,49, a genotipa TT 0,29 i 0,19 (Saxena i sur., 2015). U sezonski poliestričnih ovaca travničke pramenke Držaić i sur. (2016) navode frekvencije genotipova na lokusu 606 MTNR1A gena od 0,24 za genotip CC, 0,52 za genotip CT i 0,24 za genotip TT.

Frekvencije genotipova na lokusu 612 MTNR1A gena u istraživanim pasmina ovaca vrlo se razlikuju. Bilo da se radi o sezonski poliestričnim ili poliestričnim pasminama rezultati zastupljenosti i frekvencija pojedinih genotipova nisu dosljedne između istraživanih pasmina. Izuzev muflona, u kojeg je utvrđena najveća frekvencija genotipa AA na lokusu 612, u istraživanim pasmina ovaca najveće frekvencije su imali genotipovi GG i GA (tablica 14.) s neočekivanim rasponom utvrđenih frekvencijama od 0,25 do 0,90 za genotip GG i od 0,10 do 0,62 za genotip GA (tablica 14.). U cigaje, dalmatinske pramenke i dubrovačke ovce nije utvrđen genotip AA, dok je u istarske ovce navedeni genotip utvrđen samo u jednom uzoru s frekvencijom 0,03 (tablica 14.). Više frekvencije A alela i AA genotipa (0,66 i 0,50) u odnosu na G alel i GG genotip (0,34 i 0,18) u muflona navode Carcangiu i sur. (2010). Iz rezultata drugih autora, frekvencije genotipova na lokusu 612 MTNR1A gena u različitim pasmina ovaca vrlo su različite. Tako je u francuske Mérinos d' Arles pasmine s genetskom predispozicijom za spontanu ovulaciju tijekom proljeća frekvencije genotipova na lokusu 612 bile su 0,53 u GG genotipa, 0,47 u GA genotipa, dok genotip AA nije utvrđen (Pelletier i sur., 2000). Jedinke koje su imale nepovoljniju genetsku osnovu s obzirom na pojavu spontane ovulacije tijekom proljeća imale su i statistički značajno različite frekvencije genotipova (GG 0,29; GA 0,43 i AA 0,28; Pelletier i sur., 2000). U kineskih poliestričnih pasmina ovaca (Small Tail Han i Hu) najfrekventniji je genotip GG (0,52 i 0,63), zatim genotip GA (0,47 i 0,33), dok su frekvencije AA genotipa vrlo niske (0,01 i 0,04). Nasuprot navedenom u sezonski poliestričnih pasmina (Suffolk, Dorset i German Mutton Merino) najfrekventniji genotip je bio GA (0,46; 0,67 i 0,71), zatim GG (0,33; 0,23 i 0,19), dok su frekvencije AA genotipa bile (0,21; 0,10 i 0,10; Chu i sur., 2006). Talijanska pasmina Sarda bila je predmetom brojnih istraživanja kojima su utvrđene vrlo slične frekvencije genotipova na lokusu 612 MTNR1A gena i to za genotip GG od 0,53 do 0,68, genotip GA od 0,19 do 0,33 i genotip AA 0,2 do 0,19 (Carcangiu i sur., 2009; 2011; Mura i sur., 2010; Luridiana i sur., 2015). U tri pasmine ovaca iz Turske Şeker i sur. (2011) navode izrazito velike frekvencije GG genotipa od 0,60 do 0,80, niže frekvencije GA genotipa od 0,20 do 0,40, dok genotip AA nije bio utvrđen u turskih tradicionalnih pasmina ovaca Awassi, bijele Karaman i Chios. U ovaca travničke pramenke, koja se smatra izrazito sezonski poliestrična pasmina, kao i u većine sezonski poliestričnih autohtonih pasmina obuhvaćenih predmetnim istraživanjem, utvrđene su visoke frekvencije GG genotipa (0,76), dok su frekvencije genotipa GA iznosile 0,24, a genotip AA nije bio utvrđen (Držaić i sur., 2016).

Visoke frekvencije heterozigota, prvenstveno na lokusu 612 MTNR1A gena u istraživanim pasmina ovaca, prvenstveno sezonski poliestričnih, moguće je objasniti nesvjesnom selekcijom samih uzgajivača ovaca. Slična situacija prisutna je u Sarda

talijanske pasmine ovaca u koje su utvrđene visoke frekvencije homozigota CC i GG. Međutim, većina uzgajivača navedene pasmine provodi selekciju kroz empirijske sheme te se za remont stada odabiru šilježice od ovaca ojanjenih tijekom jeseni, odnosno te ovce su imale estrus u proljeće ili rano ljeto (Carcangiu i sur., 2009).

Promatrajući dobivene kombinacije genotipova na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena istraživanih jedinki najfrekventnije kombinacije su bile CT/GA (606/612) (27,79%) te TT/GG (606/612) sa 27,11%, što je u suglasju s rezultatima Mateescu i sur. (2009). Navedeni autori tvrde da dva polimorfizma (606 i 612) nisu u ravnoteži vezanosti gena (engl. *linkage equilibrium*), s obzirom da su u njihovoj populaciji ovaca CC/AA, CT/GA i TT/GG genotipovi imali više frekvencije od očekivanih, dok su preostali genotipovi izostali ili su bili prisutni u znatno nižim frekvencijama. Međutim, iz rezultata predmetnog istraživanja i usporedbe s rezultatima Mateescu i sur. (2009) vidljivo je da su dobiveni rezultati vrlo slični, osim kombinacija CT/GG i CC/GA s 16,86% i 9,79%. Za navedene kombinacije genotipova utvrđene su znatno veće frekvencije od one utvrđene u ovaca obuhvaćenih predmetnim istraživanjem.

Za većinu pasmina obuhvaćenih predmetnim istraživanjem rezultati χ^2 -testa pokazuju da se dobiveni genotipovi oba lokusa MTNR1A gena nalaze unutar Hardy-Weinbergove ravnoteže, izuzev lokusa 612 u bovske ovce ($P < 0,01$) te oba lokusa u dubrovačke ovce ($P < 0,01$; tablica 15.). Najizgledniji uzrok nesrazmjera genotipova u populaciji dubrovačke ovce je pojava genetskog uskog grla (engl. *bottleneck*), odnosno smanjenjem broja jedinki dubrovačke ovce koji je rezultirao smanjenjem broja alela i sukladno, promjenom frekvencija genotipova. Naime, osamdesetih godina XX stoljeća uzgoj ovaca na području Dubrovačko-neretvanske županije postupno je zenemarivan, navedenom je doprinio Domovinski rat, te narušavanje čistokrvnosti uzgoja uplivom krvi ovnovima različitih pasmina (Mioč i sur., 2003). Također, smanjen genetskoj varijabilnosti MTNR1A gena zasigurno je pridonio i utjecaj osnivača (engl. *founder effect*). Krajem 90-tih godina prošlog stoljeća krenulo se s programom očuvanja spomenute pasmine osnivajem nukleus stada od samo 112 ženskih grla (74 odrasle ovce i 38 šilježica) te 3 ovna (osobna komunikacija s autorima iz rada Mioč i sur., 2003). Stoga je današnja populacija dubrovačke ovce od 691 ovce i 36 ovnova (HPA, 2016) zasnovana na genetskom materijalu od samo 3 ovna. Da dobiveni genotipovi MTNR1A gena na lokusu 606 i/ili 612 ne odstupaju značajno od Hardy-Weinbergove ravnoteže navode Kaczor i sur. (2006) u poljske planinske ovce, Şeker i sur. (2011) u Awassi, bijele Karaman i Chios pasmine, Teyssier i sur. (2011) u Merinos d' Arles pasmine, Saxena i sur. (2014) u Chokla pasmine te Držaić i sur. (2016) u travničke pramenke. Suprotno, Kaczor i sur. (2006) u Olkuska, Suffolk i križanaca merina i romanovske ovce te Luridiana i sur. (2015) u Sarda

pasmine utvrdili su da frekvencija GA genotipa na lokusu 612 nije unutar Hardy-Weinbergove ravnoteže zbog malog broja heterozigota (GA).

5.3. Varijabilnost nukleotidnog slijeda MTNR1A gena ovaca

Određivanjem nukleotidnog slijeda drugog egzona MTNR1A gena potvrđena je prisutnost polimorfizama na lokusu 606 (C606T) i 612 (G612A) te još 6 mutacija (G453T, G706A, G783A, G801A, C891T i C893A; tablica 19.). Navedene dvije mutacije C606T i G612A ne dovode do promjene aminokiseline u slijedu, stoga ih se naziva tihe (engl. *silent*) ili ne kodirajuće mutacije. Sedam mutacija utvrđenih predmetnim istraživanjem identično je mutacijama indijskih pasmina ovaca (Saxena i sur., 2014; Saxena i sur., 2015), u kojih su još utvrđene četiri mutacije (C426T, G555A, G675A, G931C), zatim mutacijama talijanske pasmine Sarda (Carcangiu i sur., 2009) te mutacijama Merino d'Arles i Ile-de-France pasmine (Pelletier i sur., 2000), iako su u zadnjih pronađene još dvije dodatne mutacije (C426T i G555A). Šest mutacija je bilo identično mutacijama utvrđenih u španjolske Rasa Aragonesa pasmine (Martínez-Royo i sur., 2012) u koje je utvrđeno još pet mutacija na drugom egzonu MTNR1A gena (363, 383, 385, 522 i 1047). Također, pet mutacija predmetnog istraživanja bilo je identično mutacijama poliestričnih i sezonski poliestričnih kineskih pasmina ovaca u istraživanju Chu i sur. (2006).

Utvrđene mutacije G706A i C893A drugog egzona MTNR1A gena dovele su do promjene aminokiseline na pozicijama 220 i 282 što je sukladno rezultatima drugih autora (Pelletier i sur., 2000; Carcangiu i sur., 2009; Martínez-Royo i sur., 2012; Saxena i sur., 2014). Međutim, Chu i sur. (2006) i Saxena i sur. (2015) utvrdili su samo jednu promjenu aminokiseline, valin u izoleucin na poziciji 220, dok su Saxena i sur. (2014) osim navedene dvije mutacije utvrdili i postojanje treće na poziciji 295 koja mijenja aminokiselinu alanin u prolin nazvanu mutacijom G931C.

Martínez-Royo i sur. (2012), osim 11 polimorfizama na drugom egzonu MTNR1A gena utvrdili su i 17 polimorfizama na promotornoj regiji navedenog gena. Navedeni polimorfizmi promotorne regije bili su G341A, C422T, G423T, C436T, C482T, G521A, A527G, C555T, T637C, G645A, T648G, G677A, C686T, A750G, A791G, C813T i C895T. Neki od navedenih polimorfizama utječu na vezujuće elemente transkripcijskih čimbenika u promotornoj regiji gena. Stoga, Martínez-Royo i sur. (2012), navode da su polimorfizmi na poziciji 422 (C/T) i 423 (G/T) prisutni u EF2 konsenzusnom mjestu, polimorfizmi 436 (C/T), 527 (A/G) i 686 (T/C) su prisutni u SRY mjestu, polimorfizam na poziciji 482 (T/C) u

Nkx-2 motifu i dodatni polimorfizam na poziciji 750 (G/A) utječe na Brn-2 i Oct-1 mjesto prema GenBank referenci (Ay524665).

Pokazalo se da je mutacija G706A koja dovodi do zamjene aminokiseline valina za izoleucin u petoj transmembranskoj domeni receptora u bliskom kontaktu s mutacijom histidina 211 koja modificira afinitet receptora za ¹²⁵I melatonin (Conway i sur., 1997). Međutim, Trecherel i sur. (2010) utvrdili su da navedena mutacija ne mijenja transdukcijski signalni puta c-AMP-a. Mutacija na poziciji G893A dovodi do zamjene aminokiselina alanina asparginskom kiselinom u trećoj ekstracelularnoj regiji receptora (Saxena i sur., 2014).

Dvije promjene aminokiselina (V220I i A282D) utvrđene u Merino d'Arles i Ile-de-France pasmine (Pelletier i sur., 2000), Sarda pasmine (Carcangiu i sur., 2009), Rasa Aragonesa pasmine (Martínez-Royo i sur., 2012) i Chokla pasmine (Sexena i sur., 2014) utvrđene su u pasminama ovaca i u ovom istraživanju. Barrett i sur. (1997), tvrde da navedene promjene aminokiselina ne bi trebale mijenjati funkcionalnost receptora s obzirom da promjena aminokiselina nije dio transmembranske domene receptora melatonina (Carcangiu i sur., 2009).

5.4. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na sezonsku poliestričnost

Sposobnost ovaca da se pare, koncipiraju i janje izvan određene sezone kvantitativno je svojstvo važno za unaprjeđenje gospodarskog aspekta ovčarstva, ponajprije pomoću većeg indeksa janjenja i/ili povećanjem udjela ovaca u stadu koje se janje izvan sezone. Dok povećanje indeksa janjenja može poboljšati efikasnost stada, janjenja ovaca izvan sezone omogućuje kontinuiranu opskrbu tržišta svježom i mladom janjetinom (Mateescu i sur., 2009). Da polimorfizam MTNR1A gena ima povoljan utjecaj na izvansezonsku pojavu estusa sugeriraju rezultati Pelletier i sur. (2000) i Mateescu i sur. (2009) koji navode da je reprodukcija ovaca s GG genotipom tijekom dužeg fotoperioda uspješnija nego u ovaca s genotipom AA.

Na osnovu rezultata predmetnog istraživanja ne može se jasno definirati utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na janjenja ovaca izvan sezone. Promatrajući distribuciju janjenja ovaca s obzirom na genotip na lokusu 606 MTNR1A gena primjetno je da sva tri genotipa odlikuje najveći broj sezonskih janjenja (zima i proljeće). Međutim, iako je u ljetnom razdoblju evidentirano samo 20 janjenja, 19 janjenja je bilo do jedinki CC i CT genotipa (tablica 20.) što je sukladno rezultatima Chu i sur. (2006) i Carcangiu i sur.

(2009), gdje se navedene genotipove povezuje s vansezonskim janjenjima. Nadalje, u jesen je evidentiran podjednak broj janjenja CT i TT genotipa, dok se najmanje ovaca CC genotipa janjilo u jesen što nije u skladu s podacima Chu i sur. (2006) i Carcangiu i sur. (2009). Ovisno o pasmini i prisutnosti genotipa na lokusu 606 MTNR1A gena distribucije janjenja ovaca uvelike razlikuju, a zbog lokalne važnosti istraživanih pasmina dobivene rezultate je teško uspoređivati s onima iz literature. Zbog nedosljednosti dobivenih rezultata po pitanju janjenja ovaca pojedinih genotipova u istraživanim sezonama ne može se jasno povezati polimorfizam na lokusu 606 MTNR1A gena istraživanih pasmina ovaca sa sezonskom poliestričnošću.

Kao i u slučaju polimorfizma na lokusu 606 distribucija janjenja s obzirom na genotip na lokusu 612 je identična, s najvećim brojem ovaca sva tri genotipa koje su se janjile sezonski (zima i proljeće), što je zasigurno posljedica istraživanog genetskog profila pasmina koje odlikuje sezonska pojava estrusa. Međutim, u ljeto i jesen što je izvan uobičajene sezone po broju evidentiranih janjenja dominiraju jedinke GG i GA genotipa (tablica 21.) koje su ostvarile 18 od 20 janjenja ljeti i 113 od 121 janjenja u jesen. Iako je izvan sezone (ljeto i jesen) ukupno evidentiran mali broj janjenja vidljivo je da u navedenim janjenjima dominiraju genotipovi s prisutnim G alelom na lokusu 612 MTNR1A gena. Na taj način potvrđena je povezanost navedenih genotipova s mogućnosti ovaca da se pare i, posljedično, janje i izvan uobičajene sezone što je u skladu s podacima Pelletier i sur. (2000), Notter i Cockett (2005), Carcangiu i sur. (2009) i Mura i sur. (2010). Svakako treba napomenuti da utjecaj genotipa na pojavu janjenja izvan sezone nije bio statistički značajan, što može biti posljedica malog broja evidentiranih janjenja izvan sezone (ljeto i jesen; 141 janjenje) u odnosu na broj sezonskih janjenja (zima i proljeće; 1 137 janjenja).

S obzirom na prisutnost pojedinih genotipova na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena za različite pasmine ovaca neki autori navode suglasne rezultate, dok se rezultati drugih autora uvelike razlikuju. Tako u ovaca francuske pasmine Merion d' Arles GG genotipa utvrđena je pojava spolnog ciklusa u proljeće (Pelletier i sur., 2000), dok su Chu i sur. (2006) utvrdili u kineskih pasmina ovaca s prisutnošću navedenog genotipa cjelogodišnju estrusnu aktivnost. Nadalje, Notter i Cockett (2005) tvrde da je prisutnost samo jedne kopije G alela na lokusu 612 MTNR1A gena dovoljna za određivanje reproduktivne aktivnosti ovaca koja je manje sezonski ovisna u nekoliko pasmina ovaca iz Sjeverne Amerike. U skladu s navedenim, Carcangiu i sur. (2009) navode veći postotak ojanjenih ovaca pasmine Sarda CC (65%) i GG (80%) genotipa u razdoblju rujan-prosinac u odnosu na ovce TT (35%) i AA (20%) genotipa, dok je udio ojanjenih ovaca CT i GA genotipa u razdoblju rujan-prosinac i siječanj-travanj bio podjednak. Također, autori navode veću zastupljenost sezonskih janjenja (siječanj-travanj) u TT (55%) i AA (78%)

genotipa. Proučavajući utjecaj egzogenog melatonina u šilježica pasmine Sarda na reprodukciju aktivnost u životinja GG genotipa Mura i sur. (2010) pretpostavljaju da je moguće da su jedinke navedenog genotipa osjetljivije na melatonin i da im je dovoljno kraće vrijeme stimulacije za početak reprodukcije aktivnosti. Također je moguće, da životinje AA genotipa vežu veće količine melatonina, ali je prijenos signala nižeg intenziteta. Stoga životinje navedenog genotipa trebaju dužu izloženost melatoninu. Navedeno bi objasnilo jaku povezanost između AA genotipa i fotoperioda, s obzirom da navedene životinje trebaju visoke i dugotrajne razine melatonina u krvi da bi bile stimulirane kao tijekom kratkog fotoperioda (Mura i sur., 2010). Iako je poznato da muflon, kao i sve ostale divlje životinjske vrste odlikuje izrazita sezonska pojava estrusa, a samim time i janjenja, Carcangiu i sur. (2010) tvrde da se jedinke muflona GG genotipa u sezoni janje ranije (veljača – 15. ožujak) u odnosu na jedinke AA genotipa koje se janje kasnije (15. ožujak – travanj), dok se jedinke GA genotipa janje podjednako u oba razdoblja. S obzirom da su uzorci muflona prikupljeni odstrelom ženskih jedinki iz lovišta, utjecaj genotipa na lokusu 612 MTNR1A gena na raniju pojavu janjenja nije bio proučavan. Povoljan utjecaj polimorfizama na lokusu 612 utvrđen je nakon sinkronizacije estrusa i umjetne oplodnje ovaca Sarda pasmine u proljeće na način da su jedinke GG i GA genotipa imale veći udio gravidnosti i višu stopu janjenja u odnosu na ovce AA genotipa (Carcangiu i sur., 2011). Autori su došli do spoznaje da polimorfizam na navedenom lokusu može mijenjati utjecaj melatonina na jajnike, odnosno, moguće je da je utjecaj melatonina na jajnike povećan u ovaca s GG genotipom što rezultira većom plodnosti tijekom razdoblja s dugim fotoperiodom. Stoga u talijanske pasmine Sarda postoji korelacija između MTNR1A genotipa i reprodukcijanskog odgovora koji uslijedi nakon sinkronizacije i umjetne oplodnje u proljeće (Carcangiu i sur., 2011).

Međutim, Hernandez i sur. (2005) u francuske Ile de France pasmine nisu utvrdili razliku između GG i AA genotipa početkom, kao ni tijekom trajanja pripusne sezone, a razlika nije utvrđena niti u broju ciklusa na jajnicima tijekom sezone. Nadalje, Teyssier i sur. (2011) zaključuju da između genotipova na lokusu 612 u Merino d'Arles pasmine nema statistički značajne razlike u pojavi estrusa početkom travnja. Međutim, treba istaknuti da se ovulacija u navedenom istraživanju javila samo u životinja GG i GA genotipa. Sukladno navedenim rezultatima, Martínez-Royo i sur. (2012) u španjolske pasmine Rasa Aragonesa navode da prisutnost GG genotipa na lokusu 612 MTNR1A gena nije dosljedno povezana sa sezonskom pojavom estrusa. Autori su utvrdili da je u ovaca TT genotipa na lokusu 606 uočena veća estrusna aktivnost tijekom razdoblja anestrusa, dok su Chu i sur. (2006) i Carcangiu i sur. (2009) utvrdili da je CC genotip povezan s pojačanom estrusnom aktivnosti ovaca u navedenom razdoblju. Navedena

nedosljednost između utjecaja genotipova na pojavu estrusa izvan sezone, kao i spoznaje da navedeni polimorfizmi ne uzrokuju mutacije, indiciraju da drugi geni usko povezani s regulatornom sekvencom MTNR1A gena mogu utjecati na sposobnost pasmine da se pari izvan sezone (Martínez-Royo i sur., 2012).

Iako brojna istraživanja u različitim pasmina ovaca navode povezanost polimorfizama MTNR1A gena i sezonske poliestričnosti ovaca (Pelletier i sur., 2000; Notter i Cockett, 2005; Chu i sur., 2006; Carcangiu i sur., 2009; Mura i sur., 2010), postoje i ona kojima to nije potvrđeno (Hernandez i sur., 2005; Teyssier i sur., 2011; Martínez-Royo i sur., 2012) što je u skladu s rezultatima predmetnog istraživanja. Neki od razloga izostanka utjecaja polimorfizama MTNR1A gena na sezonsku poliestričnosti ovaca mogu biti razlike između pasminama ovaca i/ili okolišnih uvjeta. Navedeno je potkrijepljeno spoznajama da u ovnova merino pasmine hranidba ima snažan utjecaj na ekspresiju sezonalnosti, dok u pasmina s izraženijom sezonalnosti, kao što je Suffolk, navedeno nije dokazano (Hafez, 1952; Martin i sur., 1999). Nadalje, genetski utjecaj, odnosno razlike u sezonalnosti između pasmina, izraženije su ukoliko su životinje veće tjelesne mase i obilnije hranjene, dok je genetski utjecaj umanjen ograničenom hranidbom (Hötzel i sur., 2003). Stoga je moguće da je utjecaj polimorfizama MTNR1A gena više ili manje uvjetovan kondicijom životinja, odnosno tjelesnom masom (Hernandez i sur., 2005).

5.5. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju

Dob ovce pri prvom pripustu, odnosno dob pri prvom janjenju važna je reproduksijska osobina, s obzirom da je cilj uzgajivača mladu ovcu (šilježicu) pripustiti što prije, naravno kada je i fiziološki spremna za gravidnost i laktaciju. Životnu proizvodnju janjadi po ovci moguće je povećati skraćivanjem neproduktivnih razdoblja u proizvodnom životu ovce, a jedno od najneproduktivnijih razdoblja u ovaca je ono od odbića do prvog pripusta (Gordon, 1997). Prednost ranijeg pripusta šilježica u dobi od 7 do 8 mjeseci i koji rezultira janjenjem u dobi od oko godine dana, smanjeni su troškovi hranidbe i držanja prije početka reprodukcije, kraći generacijski interval s bržim genetskim napretkom i povećana životna proizvodnja (Gordon, 1997). Posljednjih godina intenzivnija istraživanja MTNR1A gena u ovaca dovode u vezu polimorfizam na lokusu 612 navedenog gena s ranijim ulaskom ovaca u reprodukciju, te posljedično i janjenjem u ranijoj dobi (Mateescu i sur., 2009). Iako su navedeni autori utvrdili povoljan utjecaj GG i GA genotipa na raniji pripust i janjenje ovaca, navedeno nije potvrđeno predmetnim

istraživanjem. Dob ovaca pri prvom janjenju bila je podjednaka u svih genotipova, a u homozigota TT (606) i AA (612) MTNR1A gena ovce su se prvi puta ojanjile u dobi od samo 500 i 486 dana u odnosu na preostala dva genotipa na istim lokusima. Međutim, utvrđene razlike između istraživanih genotipova (pasmina) nisu bile statistički značajne. Kada se utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na dob ovaca pri prvom janjenju promatra po pasminama, predmetnim istraživanjem nisu utvrđene statistički značajne razlike u dobi pri prvom janjenju između genotipova na lokusu 606, kao ni na lokusu 612. Dok se u istraživanih pasmina ovaca polimorfizam na lokusu 606 MTNR1A gena ne može ni na koji način povezati s ranijim janjenjem ovaca, na lokusu 612 u nekih pasmina vidljiv je povoljan utjecaj polimorfizma, odnosno genotipa GG na manju dob pri prvom janjenju u odnosu na genotip AA. Tako su u cigaje, dalmatinske pramenke, istočnofrizijske ovce, ličke pramenke i romanovske ovce GG genotipa utvrđena ranija janjenja, i to: 86, 14, 25, 99 i 7 dana u odnosu na GA genotip u cigaje i dalmatinske pramenke i AA genotip u istočnofrizijske ovce, ličke pramenke i romanovske ovce (tablica 29.).

Da utjecaj polimorfizma na lokusu 606 MTNR1A gena nema statistički značajan utjecaj na dob pri prvom janjenju utvrdili su i Mateescu i sur. (2009), dok prisutnost GG i GA genotipa na lokusu 612 rezultira sa 136 dana ranijom gravidnosti u odnosu na ovce AA genotipa. Stoga ovce s G alelom (prisutnost prepoznavajućeg mjesta za *MnII* restrikcijsku endonukleazu) mogu koncipirati u ranijoj dobi (Mateescu i sur., 2009). Iako su Mateescu i sur. (2009) utvrdili statistički značajnu razliku u dobi pri prvom janjenju između navedenih genotipova na lokusu 612 u Dorset pasmine, navedeno nije utvrđeno u pasmine Sarda (Mura i sur., 2010) u koje se vrijeme prve koncepcije šilježica nije značajnije razlikovalo između tri genotipa. Međutim, Mura i sur. (2010) utvrdili su da su ovce GG genotipa osjetljivije na implantate melatonina pokazujući važnost navedenog genotipa u reproduksijskom odgovoru na tretman melatoninom. Nadalje, navedeni autori tvrde da ovce CC, CT, GG i GA genotipa odlikuje veća plodnost i manji broj dana između uvođenja ovnova u stado i janjenja u odnosu na ovce TT i AA genotipa.

5.6. Utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na dužinu međujanjidbenog razdoblja

Međujanjidbeno razdoblje, kao i dob ovaca pri prvom janjenju, čine neproduktivna razdoblja u proizvodnom životu ovce, a njihovim skraćivanjem može se povoljno utjecati na povećanje rentabilnosti ovčarske proizvodnje. Stoga je jedan od ciljeva predmetnog istraživanja bio je utvrditi utjecaj polimorfizma na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena

na prosječno trajanje međujanjidbenog razdoblja. Prosječna dužina međujanjidbenog razdoblja nije se statistički značajno razlikovala između istraživanih genotipova na lokusu 606, kao ni između genotipova na lokusu 612 MTNR1A gena, a bila je oko godinu dana. Proučavajući utjecaj polimorfizama na lokusu 606 MTNR1A gena po pasminama, niti u jedne pasmine obuhvaćene predmetnim istraživanjem nije utvrđena nikakva povezanost polimorfizama na navedenom lokusu s trajanjem međujanjidbenog razdoblja. Štoviše, u pojedinim pasmina je uočeno da prisutnost polimorfizma (genotip CC ili CA) djeluje nepovoljnije na dužinu međujanjidbenog razdoblja od genotipa TT. Premda nisu utvrđene statistički značajne razlike kao ni povoljan utjecaj prisutnosti polimorfizma na lokusu 612 u svih istraživanih pasmina, u cigaje, dubrovačke ovce, istarske ovce, istočnofrizijske ovce i romanovske ovce primjetan je povoljan utjecaj GG genotipa na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja. Razlike u dužini međujanjidbenog razdoblja u istraživanih pasmina između GG i GA ili AA genotipa bile su od jednog do 135 dana. Najveća razlika u dužini međujanjidbenog razdoblja između genotipa GG i AA od 135 dana je uočena u romanovske ovce, ali nije bila statistički značajna.

Iako predmetnim istraživanjem u 10 različitih pasmina ovaca nije utvrđen statistički značajan utjecaj polimorfizama na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja, Mateescu i sur. (2009) navode značajan utjecaj homozigota GG i heterozigota GA na lokusu 612 na dužinu međujanjidbenog razdoblja u Dorset pasmine. Autori navode da su ovce GG i GA genotipa imale 124 dana kraći interval između prvog i drugog janjenja u odnosu na ovce AA genotipa. Stoga ovce s G alelom imaju kraći interval između prvog i drugog janjenja (Mateescu i sur., 2009). Do sličnih rezultata u Sarda pasmine došli su Luridiana i sur. (2015), koji su utvrdili kraći interval između uvođenja ovnova u stado i janjenja u ovaca GG i GA genotipa u odnosu na ovce AA genotipa, dok razlika između GG i GA genotipova nije utvrđena.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja utjecaja polimorfizama drugog egzona MTNR1A gena na lokusu 606 i lokusu 612 na sezonsku poliestričnost, dob ovaca pri prvom janjenju i prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja može se zaključiti sljedeće:

1. Prisutnost polimorfizma na lokusu 606 MTNR1A gena (genotip CC) utvrđena je u gotovo svih istraživanih populacija izuzev cigaje i dubrovačke ovce. Posljedično utvrđenim frekvencijama genotipova, visoka frekvencija alela C utvrđena je u muflona (0,93) te romanovske i Suffolk pasmine, dok su u sezonski poliestričnih pasmina ovaca (bovška ovca, cigaja, dalmatinska pramenka, dubrovačka ovca, istarska ovca, lička pramenka i paška ovca) utvrđene veće frekvencije alela T.
2. Prisutnost polimorfizma na lokusu 612 MTNR1A gena (genotip GG) utvrđena je u svih istraživanih pasmina ovaca, izuzev muflona. U muflona je utvrđena visoka frekvencija alela A (0,93), kao i u istočnofrizijske ovce (0,51), dok je u gotovo svih istraživanih pasmina ovaca, bez obzira jesu li sezonski poliestrične ili ne, utvrđena visoka frekvencija alela G (od 0,50 do 0,95).
3. Utvrđeni genotipovi MTNR1A gena na oba istraživana lokusa u većine pasmina ovaca statistički ne odstupaju značajno od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Statistički značajno odstupanje utvrđenih genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže utvrđeno je na lokusu 612 u bovške ovce te na oba lokusa (606 i 612) u dubrovačke ovce. U slučaju dubrovačke ovce razlog može biti pojava genetskog uskog grla (engl. *bottleneck*) i utjecaj osnivača (engl. *founder effect*).
4. S obzirom na utvrđene genotipove na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena statistički značajne razlike utvrđene su između muflona i svih istraživanih pasmina ovaca te između romanovske i preostalih istraživanih pasmina, izuzev istočnofrizijske ovce na lokusu 612.
5. Utvrđene kombinacije genotipova s obzirom na prisutnost ili izostanak polimorfizma na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena između istraživanih populacija značajno su bile različite. Tako su u muflona utvrđene samo dvije kombinacije (CC/AA i CT/GA) dok je u istarske ovce utvrđeno čak sedam od devet mogućih kombinacija genotipova. Kombinacija CC/AA (606/612) je bila najfrekventnija u muflona (86,67%), kombinacija CT/GA (606/612) bila je najučestalija u dubrovačke ovce (50,00%), bovške ovce (43,33%), istočnofrizijske ovce (42,11%) i Suffolka (34,29%). Kombinacija TT/GG (606/612) bila je najučestalija u cigaje (58,06%), dalmatinske pramenke (42,50%), istarske ovce (40,00%) i ličke pramenke (30,00%), kombinacija CT/GG (606/612) u paške ovce

- (31,43%), dok je u romanovske ovce bila najfrekventnija kombinacija CC/GA (606/612) s udjelom od 31,25%.
6. Određivanjem slijeda nukleotida na istraživanom dijelu drugog egzona MTNR1A gena potvrđena je prisutnost ili izostanak polimorfizama na lokusu 606 i lokusu 612. Na istraživanom nukleotidnom slijedu utvrđeno je još šest mutacija i to: G453T, G706A, G783A, G801A, C891T i C893A. Mutacije na poziciji 706 i 893 bile su funkcionalne i dovele su do promjene aminokiseline valin u izoleucin te aminokiseline alanin u asparginsku kiselinu.
 7. Najveći broj janjenja istraživanih pasmina ovaca bio je zimi (61,89%), zatim u proljeće (27,07%), dok se u jesen ojanjilo 9,47%, a ljeti samo 1,56% ovaca. U svih genotipova (CC, CT, TT, GG, GA i AA) najveći udio janjenja bio je zimi, iako je tijekom ljeta i jeseni utvrđeno oko 11% janjenja. Po broju janjenja dominirali su homozigoti CC i GG te heterozigoti CT i GA za oba promatrana lokusa.
 8. Prisutnost polimorfizama na lokusima 606 i 612 nije imala statistički značajan utjecaj na dob ovce pri prvom janjenju, a najpovoljnijim se pokazao genotip AA sa 468 dana.
 9. Prisutnost polimorfizama na lokusima 606 i 612 nije imala statistički značajan utjecaj na prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja, a najpovoljnijim se pokazao genotip AA sa 360 dana međujanjidbenog razdoblja.

Rezultati predmetnog istraživanja pokazuju da u istraživanih pasmina ovaca polimorfizmi na lokusu 606 i lokusu 612 MTNR1A gena nemaju izravan utjecaj na sezonsku poliestričnost, dob pri prvom janjenju i prosječnu dužinu međujanjidbenog razdoblja.

S obzirom na rezultate predmetnog istraživanja kao i na oprečne rezultate dostupne iz literature za utjecaj polimorfizama MTNR1A gena na pojavu estrusa izvan sezone, janjenje ovaca pri mlađoj dobi i kraće međujanjidbeno razdoblje čini se da navedeni polimorfizam čini mali dio genetske varijacije koja određuje sezonalnost reprodukcije u ovaca i uvelike ovisi o pasmini i okolišnim čimbenicima.

Potrebna su daljnja istraživanja s većim brojem uzoraka iz kontroliranih stada, boljom evidencijom reprodukcije i što manjim utjecajem okolišnih čimbenika u cilju jasnijeg utvrđivanja utjecaja polimorfizama MTNR1A gena na sezonsku poliestričnost ovaca.

7. POPIS LITERATURE

1. Adam C.L., Robinson J.J. (1994). The role of nutrition and photoperiod in the timing of puberty. *Proc Nutr Soc* 53: 89–102
2. Altum A., Ugur-Altum B. (2007). Melatonin: Therapeutic and clinical utilization. *Int J Pract* 61(5): 835-845
3. Arendt J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod* 3: 13-22
4. Armstrong S.M., Cassone V.M, Chesworth M.J., Redman J.R., Short R.V. (1986). Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J Neural Transm* 21: 375-394
5. Arroyo L.J., Gallegos-Sánchez J., Villa-Godoy A., Berruecos J.M., Perera G., Valencia J. (2007). Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19 degrees north latitude. *Anim Reprod Sci* 102(1-2): 24-30
6. Arsen'ev D.D. (1973a). Heritability of selection traits in different genealogical groups of Romanov sheep (in Russian). *Trudy Yaroslavskoga Nauchno Issledovatel'skogo Instituta Zhivotnovodstva I Kormoproizvodstva* 1973(3): 62-69. *Anim Breed Abst* 42: 1803
7. Arsen'ev D.D. (1973b). Problems of breeding Romanov sheep (in Russian). *Ovtsevodstvo* 1973(9): 10-12. *Anim Breed Abst* 42: 1774
8. Asdell S. A. (1964). *Patterns of Mammalian Reproduction*, Cornell University Press, Ithaca, New York. Compendium of Species- specific data 371-374
9. Baird D.T. (1978). Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrus cycle. *Biol Reprod* 18(3): 359-364
10. Barrell G.K., Thrun L.A., Brown M.E., Vigué C., Karsch F.J. (2000). Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. *Biol Reprod* 63(3): 769-774
11. Barrett P., Conway S., Morgan P.J. (2003). Digging deep-structure-function relationship in the melatonin receptor family. *J Pinel Res* 35(4): 221-230
12. Barrett P., Conway S., Jockers R., Strosberg A.D., Guardiola-Lemaitre B., Delagrange P., Morgan P.J. (1997). Cloning and functional analysis of a polymorphic variant of the ovine Mel 1a melatonin receptor. *Biochim Biophys Acta* 1356(3): 229-307.
13. Bartlewski P.M., Beard A.P., Cook S.J., Rawlings N.C. (1998). Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil* 113: 275-285

14. Bittman E.L., Dempsey R.J., Karsch F.J. (1983). Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology* 113(6): 2276-2283
15. Bizelis J.A., Deligeorgis S.G., Rogdakis E. (1990). Puberty attainment and reproductive characteristics in ewe lambs of Chios and Karagouniki breeds on two plans of nutrition. *Anim Reprod Sci* 23(3): 197-212
16. Bojkovski D., Cividini A., Čepon M., Holcman A., Kompan D., Kovač M., Komprij A., Žan Lotrič M., Malovrh Š., Potočnik K., Simčič M., Terčič D., Zajc P. (2014). Slovenske avtohtone in tradicionalne pasme domačih živali. Ministrarstvo za kmetijstvo in okolje, Ljubljana.
17. Bubenik G.A. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Diges Dis Sci* 47(10): 2336-2348
18. Cahill L.P., Saumande J., Ravault J.P., Blanc M., Thimonier J., Mariana J.C., Mauleon P. (1981). Hormonal and follicular relationship in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fert* 62: 141-150
19. Caput P., Ivanković A., Mioč B. (2010). Očuvanje biološke raznolikosti u stočarstvu. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
20. Carcangiu V., Luridiana S., Vacca G.M., Daga C., Mura M.C. (2011). A polymorphism at the melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene in Sarda ewes affects fertility after AI in the spring. *Reprod Fert Develop* 23(2): 376-380
21. Carcangiu V., Mura M.C., Vacca G.M., Dettori M.L., Pazzola M., Daga C., Luridiana S. (2010). Characterization of the melatonin receptor gene MT1 in muflon (*Ovis Gmelini Musimon*) and its relationship with reproductive activity. *Mol Reprod Dev* 77(3): 196
22. Carcangiu V., Mura M.C., Vacca G.M., Pazzola M., Dettori M.L., Luridiana S., Bini P.P. (2009). Polymorphism of the melatonin receptor MT1 gene and its relationship with seasonal reproductive activity in the Sarda sheep breed. *Anim Reprod Sci* 116(1-2): 65-72
23. Cardinali D.P., Vacas M.I., Boyer E.E. (1979). Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology* 105: 437-441
24. Cardinali D.P. (1981). Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev* 2: 327-346
25. Carrillo-Vico A., Calvo J.R., Abreu P., Lardone P.J., García-Mauriño S., Reiter R.J., Guerrero J.M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 18(3): 537-539

26. Carter D.S., Goldman B.D. (1983). Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology* 113(4): 1261-1267
27. Cassone V.M. (1990). Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci* 13(11) :457-464
28. Chemineau P., Pelletier J., Guérin Y., Colas G., Ravault J.P., Touré G., Almeida G., Thimonier J., Ortavant R. (1988). Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reprod Nutr Dev* 28(2B): 409-422
29. Chemineau P., Malpoux B., Delgadillo J.A., Guéin Y., Ravault J.P., Thimonier J., Pelletier J. (1992). Control of sheep and goat reproduction: Use of light and melatonin. *Anim Reprod Sci* 30(1-3): 157-184
30. Chowdhury I., Sengupta A., Maitra S.K. (2008). Melatonin: Fifty Years of Scientific Journey from the Discovery in Bovine Pineal Gland to Delineation of Functions in Human. *Indian J Biochem Bio* 45: 289-304
31. Chu M.X., Cheng D.X., Liu W.Z., Fang L., Ye S.C. (2006). Association between Melatonin Receptor 1A Gene and Expression of Reproductive Seasonality in Sheep. *Asian Austral J Anim* 19(8): 1079-1804
32. Chu M.X., Ji C.L., Chen G.H. (2003). Association between PCR-RFLP of Melatonin Receptor 1a Gene and High Prolificacy in Small Tail Han Sheep. *Asian Austral J Anim* 16(12): 1701-1704
33. Claustrat B., Brun J., Chazot G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 9(1): 11-24
34. Claypool L.E., Wood R.I., Yellon S.M., Foster D.L. (1989). The ontogeny of melatonin secretion in the lamb. *Endocrinology* 124(5): 2135-2143
35. Colledge S., Conolly J., Shennan S. (2005). The evolution of Neolithic farming from SW Asian origins to NW European limits. *Eur J Archaeol* 8(2): 137-156
36. Conway S., Canning S.J., Barrett P., Guardiola-Lemaitre B., Delagrangé P., Morgan P.J. (1997). The roles of valine 208 and histidine 211 in ligand binding and receptor function of the ovine Mel_{1aβ} melatonin receptor. *Biochem Biophys Res Co* 239: 418-423
37. Cooper G.M., Hausman R.E. (2004). Stanica: Molekularni pristup, III izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 551-553
38. Cornu C., Cognie Y. (1985). The utilization of Romanov sheep in a system of integrated husbandry. U: Land R.B., Robison D.W. (eds) *Genetics of Reproduction in Sheep*. Butterworths, London, 383-389

39. Cumming I. A., Brown J. M., Blockey M. A., Winfield C. G., Baxter R. Gooding J. R. (1971). Consistency of interval between luteinizing hormone release and ovulation in the ewe. *J Reprod Fertil* 24: 134-135
40. Djeridane Y., Touitou Y. (2001). Melatonin Synthesis in the Rat Harderian Gland: Age- and Time-related Effects. *Exp Eye Res* 72(4): 487-492
41. Cogé F., Guenin S.P., Fery I., Migaud M., Devavry S., Slugocki C., Legros C., Ouvry C., Cohen W., Renault N., Nosjean O., Malpaux B., Delagrangé P., Boutin J.A. (2009). The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT2 receptor. *Brit J Pharmacol* 158(5): 1248-1262
42. Deveson S., Forsyth I.A., Arendt J. (1992). Retardation of pubertal development by prenatal long days in goat kids born in autumn. *J Reprod Fertil* 95(2): 629-637
43. Držaić V., Kasap A., Širić I., Mioč B. (2016). Polimorfizmi MTNR1A gena u populaciji travničke pramenke. In: Pospíšil M., Vnučec I. (eds) *Proc 51st Croatian and 11th International Symposium on Agriculture, Opatija Croatia*, pp 324-238
44. Dubocovich M.L. (1988). Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J* 2(12): 2765-2773
45. Dubocovich M.L. (1995). Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 16:50-56
46. Dubocovich M.L., Rivera-Bermudez M.A., Gerdin M.J., Masana M.I. (2003). Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 1(8): 1093-1108
47. Dubocovich M.L., Markowska M. (2005). Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine* 27(2): 101-110
48. Dubocovich M.L., Delagrangé P., Krause D.N., Sugden D., Cardinali D.P., Olcese J. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. *Pharmacol Rev* 62(3): 343-380
49. Ebisawa T., Karne S., Lerner M.R., Reppert S.M. (1994). Expression cloning of a high – affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6133-3137
50. Ebling F.J., Claypool L.E., Foster D.L. (1988). Neuroendocrine responsiveness to light during the neonatal period in the sheep. *J Endocrinol* 119(2): 211-218
51. Eckstein P., Zuckerman S. (1956). In: *Marshalls Physiology of Reproduction*, vol. 1 (Parkes A.S., ur.). Longmans, Green and Co., London, str. 245-249
52. Fabre-Nys C., Martin G.B. (1991). Hormonal control of proceptive and receptive sexual behavior and the preovulatory LH surge in the ewe: Reassessment of the

- respective roles of estradiol, testosterone, and progesterone. *Horm Behav* 25(3): 295-312
53. Fahmy M.H. (1996). *Prolific Sheep*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp 47-72 i 93-98
54. FAO (2015). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics division. Dostupno na: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/E>
55. Forcada F., Abecia J.A., Sierra I. (1992). Seasonal changes in oestrous activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Ruminant Res* 8: 313-324
56. Forcada F., Abecia J.A. (2006). The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes. *Reprod Nutr Dev* 46(4): 355-365
57. Foster D.L. (1981). Mechanism for delay of first ovulation in lambs born in the wrong season (fall). *Biol Reprod* 25(1): 85-92
58. Foster D.L. (1983). Photoperiod and sexual maturation of the female lamb: early exposure to short days perturbs estradiol feedback inhibition of luteinizing hormone secretion and produces abnormal ovarian cycles. *Endocrinology* 112(1): 11-17
59. Foster D.L., Karsch F.J., Olster D.H., Ryan K.D., Yellon S.M. (1986). Determinants of puberty in a seasonal breeder. *Recent Prog Horm Res* 42: 331-378
60. Garner W.W., Allard H.A. (1920). Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J Agric Res* 18(11): 553-606
61. Godson C., Reppert S.M. (1997). The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138: 397-404
62. Goodman R.L., Pickover S.M., Karsch F.J. (1981). Ovarian feedback control of follicle-stimulating hormone in the ewe: evidence for selective suppression. *Endocrinology* 108(3): 772-777
63. Goodman R.L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrus cycle. In: *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil, J.D. Neill, eds), Raven Press, New York, 660-693
64. Gordon I. (1997). *Controlled Reproduction in Sheep and Goats. The Ewe's Oestrus Cycle and Seasonal Breeding Activity*, CAB International, University Press, Cambridge, UK, 53-85
65. Gómez-Brunet A., Santiago-Moreno J., Toledano-Díaz A., López-Sebastián A. (2012). Reproductive seasonality and its control in Spanish sheep and goats. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15(1): 47-70

66. Gonzalez A., Murphy B.D., Foote W.C., Ortega E. (1992). Circannual estrus variations and ovulation rate in Pelibuey ewes. *Small Ruminant Res* 8(3): 225-232
67. Hafez E.S.E. (1952). Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. *J Agric Sci Comb* 42:189-265
68. Hardeland R., Pandi-Perumal S.R. (2005). Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab* 2: 22
69. Hardeland R., Pandi-Perumal S.R., D.P. Cardinali (2006). Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 313-316
70. Haresign W., McLeod B.J., Webster G.M., Worthy K. (1985). Endocrine basis of seasonal anestrus in sheep. In: *Endocrine Causes of Seasonal and Lactational Anestrus in Farm Animals* (F. Ellendorff, F. Elsaesser, eds), Martinus Nijhoff, Lancaster, 6-18
71. Haresign W., Peters A.R., Staples L.D. (1990). The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flock in the UK. *Anim Prod* 50(1): 111-121
72. Hauger R.L., Karsch F.J., Foster D.L. (1977). A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology* 101(3): 807-817
73. Heape W. (1990). The sexual season of mammals. *Q J Microsc Sci* 44: 1-44
74. Hernandez X., Bodin L., Chesneau D., Guillaume D., Chemineau P., Malpoux B., Migaud M. (2005). Relationship between MT1 melatonin receptor gene polymorphism and seasonal physiological response in Île-de-France ewes. *Reprod Nutr Dev* 45: 151-162
75. Heward C.B., Hadley M.E. (1975). Structure-activity relationships of melatonin and related indoleamines. *Life Sci* 17(7):1167-1177
76. Hiendleder S., Mainz K., Plante Y., Lewalski H. (1998). Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from Urial and Argali sheep. *J Hered* 89: 113-120
77. Hiendleder S., Kaupe B., Wassmuth R., Janke A. (2002). Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *P Roy Soc B-Biol Sci* 269: 893-904

78. Hoffman K. (1973). The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight, and pelage colour in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). J Comp Physiol 85(3): 267-282
79. Hötzel M.J., Walkden-Brown S.W., Fisher J.S., Martin G.B. (2003). Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: responses to a nutritional stimulus in the breeding and non-breeding seasons. Reprod Fertil Dev 15(1-2): 1-9
80. HPA (2016). Ovčarstvo, kozarstvo i male životinje. U Godišnje izvješće za 2015. godinu, Hrvatska poljoprivredna agencija, Križevci
81. Hutchinson J.S., Robertson H.A. (1966). The growth of the follicle and corpus luteum in the ovary of the sheep. Res Vet Sci 7(1): 17-24
82. Ikegami K., Yoshimura T. (2012). Circadian clocks and the measurement of daylength in seasonal reproduction. Mol Cell Endocrinol 349: 76-81
83. Jain A., Bhatnagar M. (2007). Melatonin – A „Magic Biomolecule“. Annals of Neurosciences 14: 108-114
84. Jardas F. (1951). Dosadašnja iskustva oko merinizacije u NR Hrvatskoj. Stočarstvo 3: 97-114
85. Jardas F. (1984). Proizvodnja ovaca u Istri s osvrtom na kvalitetna svojstva tamošnje pramenke. Stočarstvo 38(1-2): 59-73
86. Kaczor U., Kmiecik M., Molik E., Rychlik T. (2006). Polymorphism in the melatonin receptor gene MT1 (locus MTNR1A) in sheep. Arch Tierz Dummerstorf 49 (SI): 257-262
87. Karasek M., Winczyk K. (2006). Melatonin in humans. J Physiol Pharmacol 57(5): 19-39
88. Karlson P. (1993). Biokemija. Školska knjiga, Zagreb.
89. Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J., Robinson, J.E. (1984): Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. Recent Prog Horm Res 40: 185-232
90. Karsch F.J., Robinson J.E., Woodfill C.J., Brown M.B. (1989). Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. Biol Reprod 41(6): 1034-1046
91. Kompan D., Erjavec E., Kastelic D., Kavčić S., Kermauner K., Rogelj I., Vidrih T. (1996). Reja drobnice. CZD Kmečki glas, Ljubljana
92. Kompan D., Zajc P., Cividini A. (2008). Mlečnost ovc v kontroliranih tropih v Sloveniji v obdobju 2007. Domžale, 17

93. Konturek P.C., Konturek S.J., Brzozowski T., Dembinski A., Zembala M., Mytar B., Hahn E.G. (1997). Gastroprotective activity of melatonin and its precursor, L-tryptophan, against stress-induced and ischaemia-induced lesions is mediated by scavenge of oxygen radicals. *Scand J Gastroenterol* 32: 433-438
94. Knight T.W., Hall D.H.R., Wilson L.D. (1983). Effects of teasing and nutrition on the duration of the breeding season in Romney ewes. *Proc NZ Soc Anim Prod*, 43: 17-19
95. Krebs J.E., Goldstein E.S., Kilpatrick S.T. (2014). *Lewin's Genes XI*. Jons & Bartlett Learnin, LLC. Burlington, USA
96. Lahlou-Kassi A., Schams D., Glatzel P. (1984). Plasma gonadotropin concentrates during the oestrous cycle and after ovariectomy in two breeds of sheep with low and high fecundity. *J Reprod Fert* 70: 165-173
97. Land R.B. (1978). Reproduction in young sheep: some genetic and environmental sources of variation. *J Reprod Fertil*, 52: 427-436
98. Lane E.A., Moss H.B. (1985). Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 61(6): 1214-1216
99. Lazovskii A.A. (1983). The origin of Romanov sheep (in Russian). *Zhivotnovodstvo* 1983(8): 29. *Animal Breeding Abstracts* 51:7035
100. Legan S.J., Karsch F.J., Foster D.L. (1977). The endocrine control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 101: 818-821
101. Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y. (1958). Isolation of melatonin, a pineal factor that lights melanocytes. *J Am Chem Soc* 80: 2057-2058
102. Lerner A.B., Case J.D., Heinzelmann R.V. (1959). Structure of melatonin. *J Am Chem Soc* 81(22): 6084-6085
103. Li D.Y., Smith D.G., Hardeland R., Yang M.Y., Xu H.L., Zhang L., Yin H.D., Zhu Q. (2013). Melatonin Receptor Genes in Vertebrates. *Int J Mol Sci* 14(6): 11208-11223
104. Lindsay D.R. (1996). Environment and reproductive behaviour. *Anim Reprod Sci* 42 (1-4): 1-12
105. Luridiana S., Mura M.C., Daga C., Diaz M.L., Bini P.P., Cosso G., Carcangiu V. (2015). The relationship between melatonin receptor 1A gene (MTNR1A) polymorphism and reproductive performance in Sarda breed sheep. *Livest Sci* 171: 78-83

106. Malpaux B., Robinson J.E., Brown M.B., Karsch F.J. (1987). Reproductive refractoriness of the ewe to inductive photoperiod is not caused by inappropriate secretion of melatonin. *Biol Reprod* 36(5):1333-1341
107. Malpaux B., Wayne N.L., Karsch F.J. (1988). Termination of the breeding season in the Suffolk ewe: involvement of an endogenous rhythm of reproduction. *Biol Reprod* 39(2): 254-263
108. Malpaux B., Robinson J.E., Wayne N.L., Karsch F.J. (1989): Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *J Endocrinol* 122: 269-278
109. Malpaux B., Karsch F.J. (1990). A role for short days in sustaining seasonal reproductive activity in the ewe. *J Reprod Fertil* 90(2): 555-562
110. Malpaux B., Viguié C., Skinner D.C., Thiéry J.C., Pelletier J., Chemineau P. (1996). Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Anim Reprod Sci* 42(1-4): 109-117
111. Malpaux B., Viguié C., Skinner D.C., Thiéry J.C., Chemineau P. (1997). Control of the Circannual Rhythm of reproduction by Melatonin in the Ewe. *Brain Res Bull* 44(4): 431-438
112. Malpaux B., Daveau A., Maurice-Mandon F., Duarte G., Chemineau P. (1998). Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: Presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone by *in situ* microimplant delivery. *Endocrinology* 139:1508-1516
113. Martin G.B., Tjondronegoro S., Boukhliq R., Blackberry M.A., Briegel J.R., Blache D., Fisher J.A., Adams N.R. (1999). Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male merino and Suffolk sheep: modification of endogenous rhythms by photoperiod. *Reprod Fertil Dev* 11(6): 355-366
114. Martínez-Royo A., Lahoz B., Alabart J.L., Folch J., Calvo J.H. (2012). Characteristics of the Melatonin Receptor 1A (MTNR1A) gene in the Rasa Aragonesa sheep breed: Association with reproductive seasonality. *Anim Reprod Sci* 133(3-4): 169-175
115. Mateescu R.G., Lunsford A.K., Thonney M.L. (2009). Association between melatonin receptor 1A gene polymorphism and reproductive performance in Dorset ewes. *J Anim Sci* 87(8): 2485-2488
116. Messer L.A., Wang L., Tuggle C.K., Yerle M., Chardon P., Pomp D., Womack J.E., Barendse W., Crawford A.M., Notter D.R., Rothschild M.F. (1997). Mapping of the melatonin receptor 1a (MTNR1A) gene in pigs, sheep, and cattle. *Mamm Genome* 8(5): 369-370

117. Migaud M., Daveau A., Malpoux B. (2005). MTNR1A melatonin receptors in the ovine premammillary hypothalamus: day-night variation in the expression of the transcripts. *Biol Reprod* 72: 393-398
118. Mioč B., Pavić V., Barać Z. (1998). Odlike eksterijera ličke pramenke. *Stočarstvo* 52(2): 93-98
119. Mioč B., Ivanković A., Pavić V., Barać Z., Sinković K., Marić I. (2003). Odlike eksterijera i polimorfizam proteina krvi dubrovačke ovce. *Stočarstvo* 57(1): 3-11
120. Mioč B., Antunac N., Čičko M., Pavić V., Barać Z. (2004). Proizvodnja i kemijski sastav mlijeka istočnofrizijskih ovaca. *Mljekarstvo* 54(1): 19-26
121. Mioč B., Pavić V., Prpić Z., Vnučec I., Barać Z., Sušić V. (2007b). Vanjština istarske ovce. In: Pospišil M (eds) *Proc 42nd Croatian and 2nd International Symposium on Agriculture*, Opatija Croatia, pp 552-555
122. Mioč B., Pavić V., Sušić V. (2007a). *Ovčarstvo*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb
123. Misztal T., Romanowicz K., Barcikowski B. (2002). Melatonin – a modulator of the GnRH/LH axis in sheep. *Reprod Biol* 2(3): 267-275
124. Moenter S.M., Caraty A., Karsch J.F. (1990). The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* 127(3): 1375-1384
125. Mura M.C., Luridiana S., Vacca G.M., Bini P.P., Carcangiu V. (2010). Effect of genotype at the MTNR1A locus and melatonin treatment on first conception in Sarda ewe lambs. *Theriogenology* 74(9): 1579-1586
126. Noel B., Bister J.L., Paquay R. (1993). Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J Reprod Fertil* 99: 695-700
127. Nosjean O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin J.M., Lefoulon F., Fauchere J. L., Delagrangé P., Canet E., Boutin J.A. (2000). Identification of the melatonin – binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Bio Chem* 275: 31311-31317
128. Notter D.R., Cockett, N.E., Hadfield T.S. (2003). Evaluation of melatonin receptor 1a as candidate gene influencing reproduction in an autumn-lambing sheep flock. *J Anim Sci* 81: 912-917
129. Notter D.R., Cockett N.E. (2005). Opportunities for detection and use of QTL influencing seasonal reproduction in sheep: a review. *Genet Sel Evol* 37(Suppl.1): S39-S53
130. Novak V. (1970). *Živinoreja*. V: *Gospodarska in družbena zgodovina Slovencev*. Zgodovina agrarnih panog. Ljubljana, Državna založba Slovenije

131. Nowak R., Rodway R.G. (1985). Effect of intravaginal implants of melatonin on the onset of ovarian activity in adult and prepubertal ewes. *J Reprod Fertil* 74(1): 287-293
132. Ortavant R., Pelletier J., Ravault J.P., Thimonier J., Volland-Nail P. (1985). Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals. *Oxford Rev Reprod Biol* 7: 305-345
133. Ortavant R., Bocquier F., Pelletier J., Ravault J.P., Thimonier J., Volland-Nail P. (1988). Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Aus J Biol Sci* 41(1): 69-85
134. Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J.M., Cardinali D.P., Poeggeler B., Hardeland R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 273(13): 2813-2838
135. Papachristoforou C., Koumas A., Photiou C. (2000). Seasonal effects on puberty and reproductive characteristics of female Chios sheep and damascus goats born in autumn or in February. *Small Rumin Res* 38: 9-15
136. Papachristoforou C., Koumas A., Photiou C. (2007). Initiation of the breeding season in ewe lambs and goat kids with melatonin implants. *Small Ruminant Res* 73: 122-126
137. Paterson A.M., Martin G.B., Foldes A., Maxwell C.A., Pearce G.P. (1992). Concentrations of plasma melatonin and luteinizing hormone in domestic gilts reared under artificial long or short days. *J Reprod Fertil* 94(1): 85-95
138. Pavić V., Mioč B., Barać Z., Vnučec I., Sušić V., Antunac N., Samaržija D. (2005). Vanjština paške ovce. *Stočarstvo* 59(2): 83-90
139. Pelletier J., Almeida G. (1987). Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. *J Reprod Fertil* 34: 215-226
140. Pelletier J., Bodin L., Hanocq E., Malpoux B., Teyssier J., Thimonier J., Chemineau P. (2000). Association Between Expression of Reproductive Seasonality and alleles of the Gene for Mel1a Receptor in the Ewe. *Biol Reprod* 62(4): 1096-1101
141. Peters J., Helmer D., von den Driesch A., Sugui S (1999). Animal husbandry in the northern Levant. *Paléorient* 25 (2): 27-48
142. Poeggeler B., Thuermann S., Dose A., Schoenke M., Burkhardt S., Hardeland R. (2002). Melatonin's unique radical scavenging properties-Roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J Pineal Res* 33(1): 20-30

143. Pope W. F., McClure K. E., Hogue D. E., Day M. L. (1989). Effect of Season and Lactation on Postpartum Fertility of Polypay, Dorset, St. Croix and Targhee Ewes. *J Anim Sci* 67: 1167-1174
144. Poulton A.L. (1987). Role of melatonin in seasonal breeding in sheep. In: *Proc of the 38th Annual Meeting of the EAAP Commission on Sheep and Goat Production* Lisabon, Portugal
145. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
146. Radogna F., Diederich M., Ghibelli L. (2010). Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol* 80: 1844-1852
147. Rako A. (1957). Istarska mliječna ovca. *Stočarstvo* 11(9-10): 423-429
148. Ravindra J.P., Rawlings N.C. (1997). Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anoestrus to the breeding season. *J Reprod Fertil* 110: 279-289
149. Reece W.O. (2015). *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 37th Edition. John Wiley & Sons, Inc
150. Reiter R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endoc Rev* 12: 151-180
151. Reiter R.J., Tan D., Galano A. (2014). Melatonin: exceeding expectations. *Physiology* 29(5): 325-333
152. Reppert S.M., Weaver D.R., Ebisawa T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13(5): 1177-1185
153. Reppert S.M., Godson C., Mahle C.D., Weaver D.R., Slaugenhaupt S.A., Gusella J.F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel_{1b} melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8734-8738
154. Reppert S.M., Weaver D.R. (1995). Melatonin Madness. *Cell* 83: 1059-1062
155. Robinson J.J. (1981). Photoperiodic and nutritional influences on the reproductive performance of ewes in accelerated lambing systems. In: *Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, Zagreb, 31. kolovoz – 3. rujan, 3(2): 1-10
156. Robinson J.E., Karsch F.J. (1984). Refractoriness to inductive day lengths terminates the breeding season of the Suffolk ewe. *Biol Reprod* 31(4): 656-663

157. Robinson J.E., Wayne N.L., Karsch F.J. (1985). Refractoriness to inhibitory day lengths initiates the breeding season of the Suffolk ewe. *Biol Reprod* 32(5): 1024-1030
158. Roche J.F., Foster D.L., Karsch F.J., Cook B., Djuik P.J. (1970). Levels of luteinizing hormone in the sera and pituitary of ewes during the estrus cycle and anestrus. *Endocrinology* 86(3): 568-572
159. Rosa H.J.D., Bryant M.J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin Res* 48: 155-171
160. Rupiće V. (2010). *Zaštita zdravlja domaćih životinja 3: Fiziologija i patologija reprodukcije*. Vlastita naklada
161. Rupiće V. (2015). *Reprodukcija domaćih životinja*. Zrinski d.d., Čakovec
162. Ryder M.L. (1984). Sheep. In: *Evolution of domesticated animals* (I.L. Mason, eds), London, New York: Longman, 63-85
163. Samardžija M., Đuričić D., Dobranić T., Herak M., Vince S. (2010). *Rasplodivanje ovaca i koza*. Veterinarski fakultet Zagreb, Zagreb
164. Sanford L.M., Howland B.E., Palmer W.M. (1984). Seasonal changes in the secretion of gonadotrophic hormones and in the endocrine response of the pituitary of male sheep in the absence of gonadal influence. *Can J Physiol Pharmacol* 62: 834-839
165. SAS (2013). *User's guide: statistics*. Version 9.2 Cary, NC: SAS Institute
166. Saxena V.K., Jha B.K, Meena A.S., Naqvi S.M.K. (2014). Ewquence analysis and identification of new variation in the coding sequence of melatonin receptor gene (MTNR1A) of Indian Chokla sheep breed. *Meta Gene* 2: 450-458
167. Saxena V.K., Jha B.K, Meena A.S., Naqvi S.M.K (2015). Characterization of MTNR1A gene in terms of genetic variability in a panel of subtemperate and subtropical Indian sheep breeds. *J Genet* 94(4): 715-721
168. Scaramuzzi R.J., Baird D.T. (1979). Ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. In: *Sheep Breeding*, 2nd Edition (G.L. Tomes, D.E. Robertson, R.J. Lightfoot, eds), Butterworths, London, 463-470
169. Scaramuzzi R.J., Adams N.R., Baird D.T., Campbell B.K., Downing J.A., Findlay J.K., Henderson K.M., Martin G.B., McNatty K.P., McNeilly A.S., Tsonis C.G. (1993). A Model for Follicle Selection and Determination of Ovulation Rate in the Ewe. *Reprod Fertil Dev* 5: 459-478
170. Scherf B.D. (2000). *World watch list for domestic animals diversity*. 3rd edition. FAO, Rim.

171. Schillo K.K., Hall J.B., Hileman S.M. (1992). Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J Anim Sci*, 70(12): 3994-4005
172. Slaugenhaupt, S.A., Roca, A.L., Liebert, C.B., Altherr, M.R., Gusella, J.F., Reppert, S.M. (1995): Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (MTNR1A). *Genomics*, 27(2): 355-357.
173. Souza C.J.H., Campbell B.K., Baird D.T. (1997). Follicular Dynamics and Ovarian Steroid Secretion in Sheep during the Follicular and Early Luteal Phases of the Estrous Cycle. *Biol Reprod* 56: 483-488.
174. Swenson M.J., Reece, W.O. (1993). *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 11th ed. Cornell University Press, New York
175. Symons A.M., Arendt J., Poulton A.L., English J. (1987). Introduction of early seasonal sensitivity to melatonin in Suffolk-Cross ewes. *Chronobiol Int* 4(2): 219-223
176. Şeker I., Özmen Ö., Çinar Kul B., Ertuğrul O. (2011). Polymorphism in Melatonin Receptor 1A (MTNR1A) Gene in Chios, White Karaman and Awassi Sheep Breeds. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 17(5): 865-868
177. Širić I., Mioč B., Pavić V., Antunović Z., Vnučec I., Barać Z., Prpić Z. (2009). Vanjština dalmatinske pramenke. *Stočarstvo* 63(4): 263-273
178. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12): 2725-2729
179. Tan D.X., Manchester L.C., Hardeland R., Lopez-Burillo S., Mayo J.C., Sainz R.M., Reiter R.J. (2003). Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res* 34(1): 75-78
180. Tan D.X., Hardeland R., Manchester L.C., Paredes S.D., Korkmaz A., Sainz R.M., Mayo J.C., Fuentes-Brptp L., Reiter R.J. (2010). The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Bio Rev Camb Philos Soc* 85(3): 607-623
181. Teyssier J., Migaud M., Dubus N., Maton C., Tillard E., Malpoux B., Chemineau P., Bodin L. (2011). Expression of seasonality in Merinos d'Arles ewes of different genotypes at the MT1 melatonin receptor gene. *Animal* 5(3): 329-336
182. Thiéry J.C., Chemineau P., Hernandez X., Migaud M., Malpoux B. (2002). Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim Endocrin* 23: 87-100
183. Thimonier J., Maulén P. (1969). Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovarienne et hypophysaire chez les ovins. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 9(2): 233-250

184. Trecherel E., Batailler M., Chesneau D., Delagrangé P., Malpoux B., Chemineau P., Migaud M. (2010). Function characterization of polymorphic variants for ovine MT1 melatonin receptors: Possible implication for seasonal reproduction in sheep. *Anim Reprod Sci* 122(3-4): 328-334
185. Turk R. (1949). Muflon. *Lovački vjesnik* 58(2): 24
186. Ungerfeld R., Forsberg M., Rubianes E. (2004). Overview of the response of anoestrous ewes to the ram effect. *Reprod Fertil Dev* 16(4): 479-490
187. Vakkuri O., Lamsa E., Rahkamaa E., Routsalainen H., Leppaluoto J. (1984). Iodinated melatonin: preparation and characterization of the molecular structure by mass and ¹H NMR spectroscopy. *Anal Biochem* 142: 284-289
188. Vigne J.D. (2011). The origins of animal domestication and husbandry: A major change in the history of humanity and the biosphere. *C R Biol* 334(3): 171-181
189. Vrdoljak J., Pavić V., Mioč B., Barać Z., Vnučec I., Prpić Z. (2007). Vanjština cigaje. *Stočarstvo* 61: 347-357
190. Walton J.S., McNeilly J.R., McNeilly A.S., Cunningham F.J. (1977). Changes in concentration of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin and progesterone in the plasma of ewes during the transition from anoestrus to breeding activity. *J Endocrinol* 75(1): 127-136
191. Ward S.J., Williams H.L. (1993). Ovarian activity and fertility during the first breeding season of Friesland ewe lambs. *Brit Vet J* 149: 269-275
192. Wayne N.L., Malpoux B., Karsch F.J. (1988). How does melatonin code for day length in the ewe: duration of nocturnal melatonin release or coincidence of melatonin with a light-entrained sensitive period? *Biol Reprod* 39(1): 66-75
193. Webb R., Gauld I.K. (1985). Genetics and physiology of follicle recruitment and maturation during seasonal anoestrus. In: *Endocrine Causes of Seasonal and Lactational Anestrus in Farm Animals* (F.Ellendorff, F. Elsaesser, eds), Martinus Nijhoff, Lancaster, 19-28.
194. Wheeler A.G., Land R.B. (1977). Seasonal variation in oestrus and ovarian activity of Finnish Landrace, Tasmanian Merino and Scottish Blackface ewes. *Anim Prod* 24(3): 363-376
195. White B.H., Sekura R.D., Rollag M.D. (1987). Pertussis toxin blocks melatonin – induced pigment aggregation in *Xenopus* dermal melanophores. *J Comp Physiol B* 157:153-159
196. Wilson D.E., Reeder D.M. (2005). *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference*. 3rd ed. Johns Hopkins University Press. Baltimore, M.D., USA

197. Witt-Enderby P.A., Radio N.M., Doctor J.S., David V.L. (2006). Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy. *J Pineal Res* 41: 297-305
198. Woodfill C.J., Wayne N.L., Moenter S.M., Karsch F.J. (1994). Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. *Biol Reprod* 50(4):965-976
199. Yuthasastrakosol P., Palmer W.M., Howland B.E. (1975). Luteinizing hormones, oestrogen and progesterone levels in peripheral serum of anoestrous and cycling ewes as determined by radioimmunoassay. *J Reprod Fert* 43: 57-65
200. Zawilska J., Nowak J.Z. (1991). Regulation of melatonin biosynthesis in vertebrate retina: Involvement of dopamine in the suppressive effects of light. *Folia Histochem Cyto* 29(1): 3-13
201. Zeder M.A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11597-11604
202. Zeuner F.E. (1963). A history of domesticated animals. London: Hutchinson
203. <http://efabis.tzv.fal.de/>
204. <http://www.egbeck.de/melatde.htm>
205. <http://www.lu-orlovkuk.com>
206. <http://www.sigmaaldrich.com>

8. ŽIVOTOPIS

Valentino Držaić rođen je 5. svibnja 1986. u Koprivnici. Osnovnu školu je završio u Hlebinama (1993. – 2001.), a Srednju gospodarsku školu, smjer poljoprivredni tehničar opći, u Križevcima (2001. – 2005.). Godine 2005. upisuje preddiplomski studij Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Akademski naziv Sveučilišni prvostupnik stječe 2008. godine obranom završnog rada pod nazivom: „Nusproizvodi pekarske industrije u hranidbi pilića“. Iste godine upisuje diplomski studij Proizvodnja i prerada mesa koji završava 2010. godine obranom diplomskog rada pod nazivom „Klaonički pokazatelji i odlike trupa jaradi hrvatske šarene koze“ te stječe akademski naziv magistar inženjer proizvodnje i prerade mesa. Godine 2011. zapošljava se na Zavodu za specijalno stočarstvo pri Agronomskom fakultetu kao asistent i upisuje poslijediplomski doktorski studij „Poljoprivredne znanosti“ pod vodstvom prof. dr. sc. Bore Mioča.

Kao asistent aktivno sudjeluje u izvođenju nastave na modulima preddiplomskih studija „Uzgoj i korištenje koza“, „Uzgoj i korištenje ovaca“ i „Izvorne pasmine i njihova zaštita“ te modulima diplomskog studija „Uzgoj koza i sustavi proizvodnje kozjeg mesa“ i „Uzgoj ovaca i sustavi proizvodnje ovčjeg mesa“. Kao suradnik, sudjeluje u provođenju znanstvenih i stručnih projekata, čiji su voditelji profesori s matičnog Zavoda za specijalno stočarstvo. Boravio je na stručnom i znanstvenom usavršavanju na Biotehniškoj fakulteti u Ljubljani, Oddelku za zootehniku u razdoblju od ožujka do lipnja, 2013. godine i od veljače do srpnja 2015. godine, pod vodstvom prof. dr. sc. Petera Dovča. Tijekom boravka proveo je dio laboratorijskih analiza uključenih u izradu doktorskog rada. Sudjelovao je na nekoliko stručnih i znanstvenih domaćih i međunarodnih skupova. Kao student poslijediplomskog doktorskog studija Poljoprivredne znanosti član je studentskog zbora Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta. Ujedno je jedan od predstavnika studenata u Odboru za međunarodnu suradnju i Fakultetskom vijeću Agronomskog fakulteta. Kao predstavnik doktoranada član je i Vijeća biotehničkog područja Sveučilišta u Zagrebu. Znanstveni i stručni interesi vezani su mu za: uzgoj koza i ovaca, tehnologiju proizvodnje kozjeg i ovčjeg mesa, uporabu molekularne genetike u animalnoj proizvodnji te utjecaj polimorfizama gena na kvantitativna svojstva domaćih životinja.

Autor je ili koautor ukupno 25 znanstvena i stručna rada od čega 5 znanstvenih radova objavljenih u časopisima a1 skupine, 9 znanstvenih i 2 stručna rada objavljena u časopisima a2 skupine te 9 znanstvenih radova koji pripadaju a3 skupini.

Popis objavljenih znanstvenih i stručnih radova te sudjelovanja na skupovima:

a1 radovi:

1. Vnućec I., Držaić V., Mioč B., Prpić Z., Antunović Z., Kegalj A. (2016). Effect of sex on meat chemical composition and fatty acid composition in suckling Pag sheep lambs. *Vet arhiv* 86 (2): 217-227
2. Kaić A., Mioč B., Širić I., Držaić V. (2016). Influence of sex and the slaughtering season on water-holding capacity and carcass composition in Istrian lambs. *Vet arhiv* 86 (1): 111-123.
3. Vnućec I., Držaić V., Mioč B., Prpić Z., Pavić V., Antunović Z. (2014). Carcass traits and meat colour of lambs from diverse production systems. *Vet arhiv* 84 (3): 251-263
4. Mioč B., Držaić V., Vnućec I., Prpić Z., Antunović Z., Barać Z. (2013). Some slaughter and meat traits of lambs and kids from an extensive production system. *Vet arhiv* 83 (3): 263-274
5. Prpić Z., Mioč B., Vnućec I., Držaić V., Pavić V. (2013). Non-genetic factors of udder morphology traits in Istrian ewes. *Mljekarstvo* 63 (2): 72-80

a2 radovi:

1. Držaić V., Kaić A., Širić I., Antunović Z., Mioč B. (2016). Boja i pH vrijednost mesa istarske janjadi. *Poljoprivreda* 22(1): 39-45
2. Širić I., Kos I., Kasap A., Petković F.Z., Držaić V. (2016). Heavy metals bioaccumulation by edible saprophytic mushrooms. *JCEA* 17(3): 884-900
3. Širić I., Kaić A., Tomić D., Držaić V., Mioč B. (2015). Utjecaj tjelesne mase pri klanju i spola na klaoničke pokazatelje i mjere razvjenosti trupova istarske janjadi. *Meso* 17 (1): 43-49
4. Držaić V., Mioč B., Baričević I. (2014). Utjecaj tjelesne mase pri klanju na neke mesne odlike romanovske janjadi u Hrvatskoj. *Meso* 16 (1): 33-39
5. Hrbud A., Mioč B., Držaić V. (2014). Reprodukcijske odlike mliječnih pasmina koza u Republici Hrvatskoj. *Stočarstvo* 68 (1): 11-17
6. Obućina P., Držaić V., Mioč B. (2014). Neke mesne odlike janjadi ličke pramenke. *Stočarstvo* 68(3): 65-70
7. Mioč B., Držaić V., Vnućec I., Barać Z., Prpić Z., Pavić V. (2012). Utjecaj spola na klaoničke pokazatelje paške janjadi. *Stočarstvo* 66 (2): 95-106
8. Mioč B., Krvavica M., Vnućec I., Držaić V., Prpić Z., Kegalj A. (2011). Klaonički pokazatelji i odlike trupova travničke pramenke. *Stočarstvo* 65 (3) 179-188
9. Držaić V., Mioč B., Pavić V., Prpić Z., Vnućec I. (2011). Utjecaj tjelesne mase pri klanju i spola na osobine trupova jaradi hrvatske šarene koze. *Meso* 13 (3): 155-160

a2 stručni radovi:

1. Držaić V., Mioč B. (2015). Povezanost polimorfizama MTNR1A gena i sezonske poliestričnosti ovaca. *Poljoprivreda* 21 (2): 73-77
2. Karolyi D., Ćurić T., Držaić V. (2012). Polimorfizmi PRKAG3 gena i kakvoća mesa svinja. *Stočarstvo* 66 (4): 279-290

a3 radovi:

1. Držaić V., Kasap A., Širić I., Mioč B. (2016). Polimorfizmi MTNR1A gena u populaciji travničke pramenke. In: Pospišil M., Vnučec I. (eds) *Proc 51th Croatian and 11th International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croatia, pp 324-328
2. Kaić A., Držaić V., Širić I., Mioč B. (2016). Mineralni sastav m. longissimus dorsi janjadi ličke pramenke. In: Pospišil M., Vnučec I. (eds) *Proc 51th Croatian and 11th International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croatia, 334-338
3. Širić I., Kos I., Kasap A., Kaić A., Držaić V. (2016). Koncentracija teških metala i bioakumulacijski potencijal crnogoričnog vrganja *Boletus edulis* Bull. ex Fr. In: Pospišil M., Vnučec I. (eds) *Proc 51th Croatian and 11th International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croatia, 56-60
4. Držaić V., Vnučec I., Barać Z., Rako Z., Mioč B. (2015). Klaonički pokazatelji i odlike trupa bračke janjadi. In: Pospišil M. (eds) *Proc 50th Croatian and 10th International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croatia, 429-432.
5. Širić I., Držaić V., Kasap A., Mioč B. (2015). Klaonički pokazatelji i odlike trupova janjadi kvarnerskih otoka. In: Pospišil M. (eds) *Proc 50th Croatian and 10th International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croatia, 471-474
6. Držaić V., Mioč B., Kasap A., Širić I., Živković M., Džaja A. (2014). Razvijenost trupova krčke janjadi s obzirom na tjelesnu masu pri klanju. In: Marić S., Lončarić Z. (eds) *Proc 49th Croatian and 9th International Symposium on Agriculture*, Dubrovnik, Croatia, 556-560
7. Držaić V., Mioč B., Baričević I., Pavić V. (2013). Neke mesne odlike romanovske janjadi u Hrvatskoj. In: Marić S., Lončarić Z. (eds) *Proc 48th Croatian and 8th International Symposium on Agriculture*, Dubrovnik, Croatia, 729-733.
8. Mioč B., Ivanković A., Širić I., Držaić V. (2013). Odlike vanjštine istarske koze. In: Marić S., Lončarić Z. (eds) *Proc 48th Croatian and 8th International Symposium on Agriculture*, Dubrovnik, Croatia, 765-769
9. Držaić V., Mioč B., Krvavica M., Prpić Z., Vnučec I. (2012). Utjecaj kastracije ovnova na klaoničke pokazatelje i kakvoću trupa. In: Pospišil M. (eds) *Proc 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture*, Opatija, Croatia, 674-678

9. PRILOZI

Prilog 1. Slike istraživanih populacija



Bovška ovca (Izvor: Bojkovski i sur., 2014)



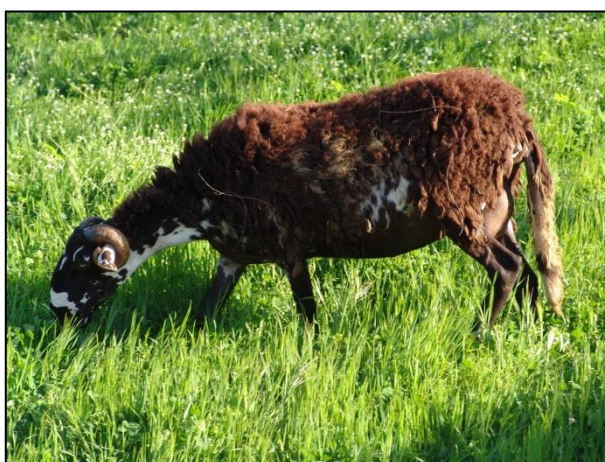
Cigaja (foto: Boro Mioč)



Dalmatinska pramenka (foto: Boro Mioč)



Dubrovačka ovca (foto: Boro Mioč)



Istarska ovca (foto: Boro Mioč)



Istočnofrizijska ovca (foto: Boro Mioč)



Lička pramenka (foto: Boro Mioč)



Paška ovca (foto: Boro Mioč)



Romanovska ovca (foto: Boro Mioč)



Suffolk (foto: Boro Mioč)



Europski muflon (*Ovis musimon*; Izvor: <http://www.lu-orlovkuk.com>)

Prilog 2. Slijed nukleotida referentne sekvence U14109 drugog egzona MTNR1A gena ovaca dužine 1 150 nukleotida

```
5'-GGGAGCTCGACGCTCTGGGGATCCACCGGCGCCGGCCCTGCCAGCGCGATGGCG
GGGCGGCTGTGGGGCTCGCCGGGCGGGACCCCCAAGGGCAACGGCAGCAGCGCGCT
GCTCAACGTCTCGCAGGCGGCGCCCGGCGCCGGGACGGTGTGCGGCCGCGGCCCT
CGTGGCTGGCCGCCACCCTCGCCTCCATCCTCATCTTCACCATCGTGGTGGACATCGT
GGGCAACCTCCTGGTGGTCCTGTCCGTGTATCGGAACAAGAAGCTGAGGAACGCAGGG
AATGTGTTTTGTGGTGAGCCTGGCAGTTGCAGACCTGCTGGTGGCCGTGTATCCGTACC
CCTTGGCGCTGGCGTCTATAGTTAACAATGGGTGGAGCCTGAGCTCCCTGCATTGCCA
ACTTAGTGGCTTCCTGATGGGCTTGAGCGTCATCGGGTCCGTTTTTCAGCATCACGGGAA
TTGCCATCAACCGCTATTGCTGCATCTGCCACAGCCTCAGATACGGCAAGCTGTATAGC
GGCACGAATTCCCTCTGCTACGTGTTCCGTGATCTGGACGCTGACGCTCGTGGCGATCG
TGCCCAACCTGTGTGTGGGGACCCTGCAGTACGACCCGAGGATCTATTCCTGTACCTTC
ACGCAGTCCGTCAGCTCAGCCTACACGATCGCCGTGGTGGTGTTCATTTTCATAGTTCC
GATGCTCGTAGTCGTCTTCTGTTACCTGAGAATCTGGGCCCTGGTTCTTCAGGTCAGAT
GGAAGGTGAAACCGGACAACAAACCGAAACTGAAGCCCCAGGACTTCAGGAATTTTGT
CACCATGTTTGTGGTTTTTGTCTCTTTGCCATTTGCTGGGCTCCTCTGAACCTCATTGG
TCTCGTTGTGGCCTCGGACCCCGCCAGCATGGCACCCAGGATCCCCGAGTGGCTGTTT
GTGGCTAGTTACTATATGGCATATTTCAACAGCTGCCTCAATGCGATCATATATGGACTA
CTGAACCAAAAATTTCAGGCAGGAATACAGAAAAATTATAGTCTCATTGTGTACCACCAAG
ATGTTCTTTGTGGATAGCTCCAATCATGTAGCAGATAGAATTAAACGCAAACCCTCTCCA
TTAATAGCCAACCATAACCTAATAAAGGTGGACTCCGTTTAA-3'
```

Žuto su označeni polimorfizmi na lokusu 606 (C) i 612 (G).

Prilog 3. Sljedovi nukleotida istraživanih populacija

```

5'-TACCCCTTGGCGCTGGCGTCTATAGTTAACAATGGGTGGAGCCTGAGCTCCCTGCAT
TGCCAACTTAGTGGCTTCCTGATGGGCTTGAGCGTCATCGGGTCCGTTTTTCAGCATCAC
GGGAATTGCCATCAACCGCTATTGCTGCATCTGCCACAGCCTCAGATACGGCAAGCTGT
ATAGCGGCACGAATTCCTCTGCTACGTGTTCCCTGATCTGGACGCTGACGCTCGTGGC
GATCGTGCCCAACCTGTGTGTGGGGACCCTGCAGTATGACCCGAGGATCTATTCCTGT
ACCTTCACGCAGTCCGTCAGCTCAGCCTACACGATCGCCGTGGTGGTGTTCATTTTCAT
AGTTCCGATGCTCGTAGTCGTCTTCTGTTACCTGAGAATCTGGGCCCTGGTTCTTCAGG
TCAGATGGAAGGTGAAACCGGACAACAAACCGAAACTGAAGCCCCAGGACTTCAGAAA
TTTTGTCACCATGTTTGTGGTTTTTGTCTCTTTGCCATTTGCTGGGCTCCTCTGAACTTC
ATTGGTCTCGTTGTGGCCTCGGACCCTGACAGCATGGCACCCAGGATCCCCGAGTGGC
TGTTTGTGGCTAGTTACTATATGGCATATTTCAACAGCTGCCTCAATGCGATCATATATG
GACTACTGAACCAAAAATTTCAGGCAGGAATACAGAAAAATTATAGTCTCATTGTGTACCA
CCAAGATGTTCTTTGTGGATAGCTCCAATCATGTAGCAGATAGAATTAACG-3'

```

Slijed nukleotida istraživanog dijela drugog egzona MTNR1A gena dužine 758 baznih parova s označenim polimorfizmima na lokusu 606 i 612 (genotip TT606 i GG612)

```

5'-TACCCCTTGGCGCTGGCGTCTATAGTTAACAATGGGTGGAGCCTGAGCTCCCTGCA
TTGCCAACTTAGTGGCTTCCTGATGGGCTTGAGCGTCATCGGGTCCGTTTTTCAGCATC
ACKGGAATTGCCATCAACCGCTATTGCTGCATCTGCCACAGCCTCAGATACGGCAAGC
TGTATAGCGGCACGAATTCCTCTGCTACGTGTTCCCTGATCTGGACGCTGACGCTCGT
GGCGATCGTGCCCAACCTGTGTGTGGGGACCCTGCAGTACGACCCRAGGATCTATTC
CTGTACCTTCACGCAGTCCGTCAGCTCAGCCTACACGATCGCCGTGGTGGTGTTCAT
TTCATAGTTCCGATGCTCGTAGTCRTCTTCTGTTACCTGAGAATCTGGGCCCTGGTTCT
TCAGGTCAGATGGAAGGTGAAACCGGACAACAAACCGAAACTGAAGCCCCAGGACTT
CAGRAATTTTGTACCATGTTTGTGGTTTTTGTCTCTTTGCCATTTGCTGGGCTCCTC
TGAACCTTCATTGGTCTCGTTGTGGCCTCGGACCCTGMCAGCATGGCACCCAGGATCC
CCGAGTGGCTGTTTGTGGCTAGTTACTATATGGCATATTTCAACAGCTGCCTCAATGC
GATCATATATGGACTACTGAACCAAAAATTTCAGGCAGGAATACAGAAAAATTATAGTCT
CATTGTGTACCACCAAGATGTTCTTTGTGGATAGCTCCAATCATGTAGCAGATAGAATT
AAACG-3'

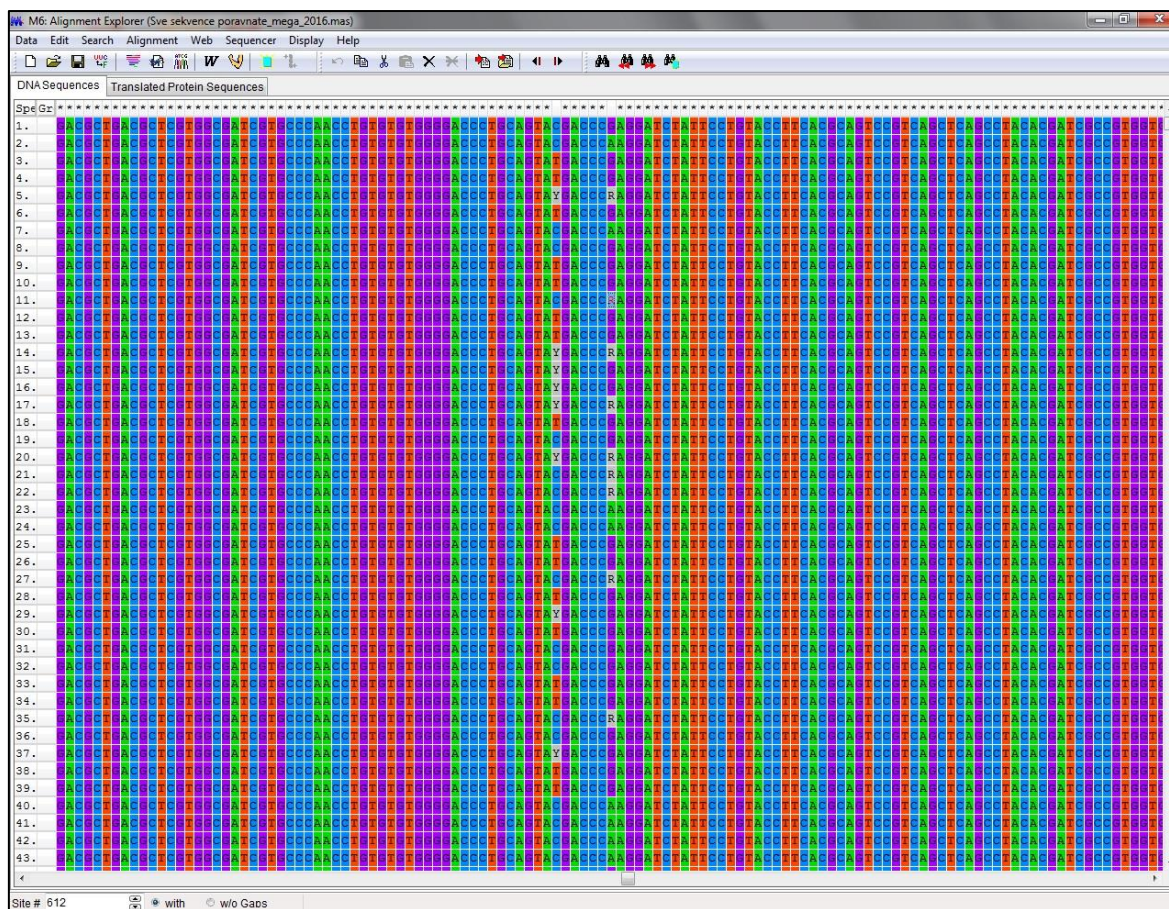
```

Slijed nukleotida istraživanog dijela drugog egzona MTNR1A gena dužine 758 baznih parova s označenim polimorfizmima na lokusu 606 i 612 (genotip CC606 i GA612)

```
5'-TACCCCTTGGCGCTGGCGTCTATAGTTAACAATGGGTGGAGCCTGAGCTCCCTGCAT
TGCCAACTTAGTGGCTTCCTGATGGGCTTGAGCGTCATCGGGTCCGTTTTTCAGCATCAC
TGGAATTGCCATCAACCGCTATTGCTGCATCTGCCACAGCCTCAGATACGGCAAGCTGT
ATAGCGGCACGAATTCCTCTGCTACGTGTTCTGATCTGGACGCTGACGCTCGTGGC
GATCGTGCCCAACCTGTGTGTGGGGACCCTGCAGTACGACCCAGGATCTATTCCTGT
ACCTTCACGCAGTCCGTCAGCTCAGCCTACACGATCGCCGTGGTGGTGTTCATTTTCAT
AGTTCCGATGCTCGTAGTCATCTTCTGTTACCTGAGAATCTGGGCCCTGGTTCTTCAGG
TCAGATGGAAGGTGAAACCGGACAACAAACCGAAACTGAAGCCCCAGGACTTCAGGAA
TTTTGTCACCATGTTTGTGGTTTTTGTCTCTTTGCCATTTGCTGGGCTCCTCTGAACTTC
ATTGGTCTCGTTGTGGCCTCGGACCCTGCCAGCATGGCACCCAGGATCCCCGAGTGGC
TGTTTGTGGCTAGTTACTATATGGCATATTTCAACAGCTGCCTCAATGCGATCATATATG
GACTACTGAACCAAAAATTTCAAGGCAGGAATACAGAAAAATTATAGTCTCATTGTGTACCA
CCAAGATGTTCTTTGTGGATAGCTCCAATCATGTAGCAGATAGAATTAAACG-3'
```

Slijed nukleotida istraživanog dijela drugog egzona MTNR1A gena dužine 758 baznih parova s označenim polimorfizmima na lokusu 606 i 612 (genotip CC606 i AA612)

Prilog 4. Poravnati slijedovi nukleotida istraživanih populacija (2.-43.) s referentnim nukleotidnim slijedom U14109 (1.)



Stupci bez zvjezdice označavaju pozicije polimorfizama na lokusu 606 i 612. (A – adenin; C – citozin; G – gvanin; T – timin; R – adenin ili gvanin; Y – citozin ili timin).