

UDK: 636.084 : 637.05

Pregledni rad

## PRIMENA METODA MOLEKULARNE GENETIKE U SELEKCIJI DOMAĆIH ŽIVOTINJA

*Radica Dedović, D. Latinović, Radmila Beskorovajni, Ljiljana Samolovac, R. Nikolić*

**Izvod:** U poslednjim decenijama dvadesetog veka, primenom metoda molekularne genetike omogućena je identifikacija gena koji utiču na variranje kvantitativnih osobina, kao i selekcija vezana za markere (MAS) koja se koristi za mapiranje genoma i procenu vezanosti gena koji utiču na ekonomski važne osobine domaćih životinja. Ovim metodama omogućeno je da se otkriju i potvrde genetske varijante proteina mleka, utvrdi otpornost organizma na bolesti i stres, odredi kvalitet mesa, izvrši determinacija pedigreea i pola, utvrdi biodiverzitet i filogenetski stadijum organizma i dr.

Primenom DNK testova metodom lančanog umnožavanja DNK (PCR) i PCR-RFLP metodom koja se zasniva na polimorfizmu restrikcionih fragmenata u mogućnosti smo da identifikujemo varijante gena koji su odgovorni za varijabilnost kvantitativnih i drugih osobina koje želimo da unapredimo selekcijom. Selekciju, koja se bazira na ovim metodama, neophodno je uključiti u već tradicionalne odgajivačke programe kako bi se efekat selekcije i ekonomska vrednost stočarske proizvodnje povećala.

**Ključne reči:** molekularna genetika, PCR, selekcija, domaće životinje

### Uvod

Polazeći od same definicije molekularne genetike da ona predstavlja nauku koja se bavi proučavanjem molekulske strukture gena, kao i njihovim funkcionisanjem u zavisnosti od date strukture, u mogućnosti smo da sagledamo na koji način pojedini geni utiču na ispoljavanje ekonomski važnih osobina domaćih životinja koje želimo da unapredimo selekcijom.

Ekonomski najvažnije osobine domaćih životinja kao što količina mleka, mesa, njihov sastav kao i prirast grla, iskorišćavanje hrane i sl. spadaju u kvantitativne osobi-

---

\* Mr Radica Dedović, asistent, dr Dušan Latinović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Zemun, Mr Radmila Beskorovajni, istraživač saradnik, mr Radiša Nikolić, istraživač saradnik, PKB INI Agroekonomik, Padinska Skela, Mr Ljiljana Samolovac, PK Beograd, Padinska Skela

ne. Na pojavu ovih osobina utiče veliki broj gena koji se međusobno kombinuju u velikom broju genotipova. Nasledna osnova kvantitativnih osobina je samim tim poligene prirode pa se njihovo nasleđivanje utvrđuje proučavanjem velikog broja jedinki kod kojih se ove osobine ispoljavaju. Dosadašnji rad na poboljšanju kvantitativnih osobina uglavnom se satiojao u proučavanju varijabilnosti jedinki koje čine određenu populaciju kao i korišćenjem metoda selekcije i ukrštanja posmatranih individua.

U poslednjim decenijama dvadesetog veka, primenom metoda molekularne genetike omogućena je indentifikacija gena koji utiču na variranje kvantitativnih osobina, kao i selekcija vezana za markere (MAS) koji se koriste za mapiranje genoma i procenu vezanosti gena koji utiču na ekonomski važne osobine domaćih životinja (*Davis i sar.*, 1992; *Archibald i sar.*, 1994).

Ovim metodama omogućeno je da se otkriju i potvrde genetske varijante proteina mleka, utvrdi otpornost organizma na bolesti i stres, odredi kvalitet mesa, izvrši determinacija pedigrea i pola, utvrdi biodiverzitet, filogenetski stadijum organizma i dr.

### **Rekombinantna DNK tehnologija**

Rekombinantna DNK tehnologija ili genetsko inženjerstvo je zajednički naziv za grupu eksperimentalnih metoda koje omogućavaju manipulaciju sa genomom živih bića. Prvi uslov za primenu rekombinantne DNK tehnologije je izolacija gena koji utiču na ispoljavanje određene osobine ili grupu osobina koje želimo da unapredimo selekcijom. Do skora ovu tehnologiju bilo je nemoguće sprovesti iz više razloga. Prvi razlog je taj što je određeni ciljni gen zastupljen u jednoj kopiji u genomu i teško ga je izolovati. Zatim, molekul DNK predstavlja složeno homogeno hemijsko jedinjenje i bilo je nemoguće hemijskim putem izdvojiti željene sekvence-delove. Poznatim hemijskim i fizičkim metodama, do polovine osamdesetih godina prošlog veka nije bilo moguće odvojiti gene jedne od drugih u molekulu DNK. Danas je to moguće primenom rekombinantne DNK tehnologije koja se zasniva na biološkim principima i mogućnošću da se manipuliše genima (izolacija, transfer, analiza).

### **PCR (Polimerase Chain Reaction)**

Sredinom osamdesetih godina dvadesetog veka napravljen je ogroman napredak u rekombinantnoj DNK tehnologiji. Američki biolog K. Mullis pronašao je način da u in vitro uslovima na genomskoj DNK otkrije željeni gen uz pomoć prajmera (primeri). Prajmeri su sekvence DNK sastavljene od 20-tak nukleotida koji služe za određivanje početka procesa umnožavanja fragmenta DNK, koga želimo da izolujemo. Na taj način počinje proces polimerizacije na tačno određenoj sekvenci DNK određenoj sa dva prajmera, na svakom kraju po jedan (5' i 3'). PCR se odvija u tri faze:

- denaturacija na 90-95 C
- aniliranje na 45-65 C
- amplifikacija na 72-75 C

Denaturacija je razdvajanje lanaca genomske DNK. Aniliranje predstavlja proces

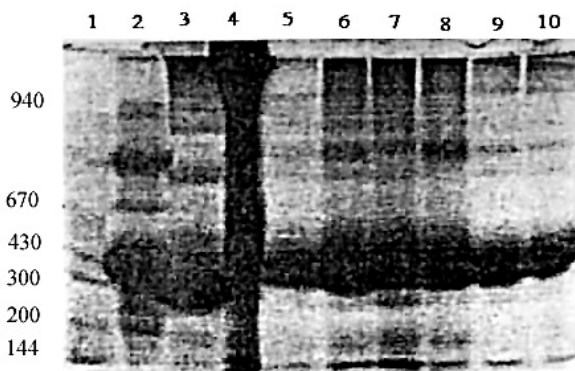
vezivanja prajmera za razdvojene lance DNK, a amplifikaciju čini proces polimerizacije, tj. dobijanja velikog broja kopija željenog fragmenta pod dejstvom specifičnog enzima DNK polimeraze.

DNK polimeraze koje su bile izolovane iz *E. coli* za vrlo kratko vreme su se denaturisale na visokoj temperaturi na kojoj se odvija razdvajanje lanaca DNK i zato se morala više puta dodavati u toku celog ciklusa. To je onemogućavalo automatizaciju čitavog ovog procesa. Metod je bio vrlo skup i dugotrajan. Danas je ovaj problem rešen na taj način što se izolacija DNK polimeraze vrši iz termofilnih bakterija čiji su enzimi rezistentni na visoke temperature. Korišćenjem Taq DNA polimerase omogućena je automatizacija PCR reakcije u posebnim aparatima (Thermal cycler). Na ovaj način dobijena sekvencija DNK u velikom broju primeraka dalje se analizira kako bi se odredila primarna struktura gena.

### Odredjivanje genetski uslovljenih varijanti proteina mleka

Od svih prisutnih proteina u kravljem mleku najzastupljeniji su kazeini. Postoje četiri različite forme kazeina (s1-, s2-, - i - kasein), i oni čine 80% svih proteina (Alexander i sar., 1998; Groenen i sar., 1992; Mercier i Vilotte 1993; Barroso i sar. 1997). Sva četiri kazein kodirana gena su grupisana oko 200-kb fragmenata hromozoma 6 (Threadgill i Womack 1990; Ferretti i sar., 1990). Za proteine mleka karakteristična je pojava polimorfizma (slika 1). Ova pojava je po prvi put ustanovljena na genu za - kazein goveda. Utvrđeno je postojanje dva najzastupljenija alela pomenutog gena i to: alel A i alel B. Alel B povoljno utiče na kvalitet i kvantitet mleka, posebno mlečnih pradevina tako što povećava radman i kvalitet sira (Madrano i sar., 1990).

Slika 1. SDS-PAGE elektroforeza proteina mleka



Legenda:

1. Marker dužina fragmenata (Molecular weight standard)
2. kazein - standard (-casein -standard)
3. kazein - standard (-casein -standard)
4. kazein - standard (-kazein - standard)
5. 10 Uzorci mleka (Milk samples)

Laktoglobulini, takođe, čine važnu komponentu mleka i njihovo prisustvo utiče ne samo na sastav mleka već i na kvalitet i prinos sira.

Određivanje genetskih varijanti - kazeina i - laktoglobulina vrši se pomoću DNK testa metodom lančanog umnožavanja DNK (PCR) i PCR-RFLP metodom koja se zasniva na polimorfizmu restrikcionih fragmenata (Stevanović i sar., 2000). Primenom ovih metoda moguće je razlikovati varijante A i B gena za - kazein i - laktoglobulin i na osnovu rasporeda traka dobijenih nakon obrade PCR produkata restrikcionim enzimima detektovati tri različita genotipa (AA, AB i BB).

Genotip BB poželjno utiče na sadržaj masti i kazeina i posebno je značajan kod krava čije se mleko koristi za dobijanje mlečnih proizvoda (*Velmalá et al.*, 1995; *Stevanović i sar.*, 2001).

Zato je posebno značajno utvrditi genetske varijante ovih proteina u mleku, identifikovati grla (nosioce) poženjih genotipova i na osnovu dobijenih rezultata vršiti dalju selekciju bikova i krava kako bi se povećala učestalost alela koji doprinose poboljšanju kvaliteta i kvantiteta mleka i mlečnih proizvoda.

### **BLAD (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency)**

Blad (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency) je nasledno, autosomalno, recesivno oboljenje koje se vezuje za Holštajn-frizijsku rasu goveda. Bolest je uzrokovana tačkastom mutacijom u CD18 genu za spoljašnji glukoproteinski receptor leukocita. Pomenuti receptor je odgovoran za kretanje neutrofila kroz vaskularni endotelijum i omogućava odbranu organizma od infekcija. Nastala mutacija dovodi do supstitucije aminokiseline 128 (D128G) pomenutog proteina i ne mogućnosti da on i dalje obavlja svoju funkciju (Shuster i sar. 1992). Bolest se samim tim ogleda u smanjenju otpornosti organizma na različite infekcije, koje najčešće dovode do smrti jedinke pre njene polne zrelosti.

Svi nosioci pomenutog D128G alela vode poreklo od jednog američkog (USA) bika. To je bio Osborndale Ivanhoe, rođen 1952. godine. Zbog visoke genetske vrednosti u progenom testu za prinos mleka izuzetno je mnogo korišćen u programima V.O. širom sveta i iza sebe je ostavio veliki broj potomaka, od kojih i znatan broj bikovskih očeva. Učestalost ovog mutiranog alela u USA iznosi oko 6% kod krava i oko 15% kod bikova (*Shuster i sar.*, 1992). Takođe, u Francuskoj postoji prosečno 6% nosioca BLAD-a u populaciji bikova i bikovskih majki (*Boichard i sar.*, 1994). U Poljskoj je frekvencija ovog oboljenja kod testiranih bikova nešto niža i iznosi 4,82% (*Natonek*, 2000). U našoj zemlji po prvim objavljenim rezultatima (*Ćirić i sar.*, 1998), učestalost nosioca mutiranog D128G alela iznosi: kod mladih bikova u testu 13,04% i 5,88% kod bikovskih majki.

DNK test, sa izuzetno visokim procentom verovatnoće može nam pružiti dokaz da li se radi o zdravoj ili individui koja nosi mutirani alel, a samim tim i omogućiti identifikaciju zdravih životinja (TL), bolesnih (BLAD) i životinja heterozigotnih nosioca (BL), (*Stevanović i sar.*, 2000). Na ovaj način vrlo brzo i pouzdano, bez obzira na uzrast i pol, u kratkom vremenskom intervalu mogu se detektovati bolesne individue, kao i heterizigotni nosioci, a sve u cilju njihove eliminacije iz odgajivačkih programa.

## Stres sindrom svinja (Porcine Stress Syndrome)

Stres sindrom svinja (PSS) je nasledno, recesivno oboljenje. Bolest dovodi do iznenadne smrti usled doživljenog stresa, koji je posledica lošeg držanja i nege životinja. Svinje osetljive na stres imaju blede i vodnjikavo meso i to je jedan od razloga velikih gubitaka u proizvodnji i preradi svinjskog mesa.

Uzrok pojave PSS-a je mutacija u Rianodin receptoru 1 gena (Ryanodine receptor 1 gene - RYR-1) koji ima važnu ulogu u transportu Ca u mišićnim ćelijama. Mutacija se dešava u 1843 nt u RYR-1 genu u kojem je citozin zamenjen timinom (Popovski i sar., 2002), tako da se na poziciji 615 u rianidinskom receptoru kod svinja osetljivih na stres nalazi cistein umesto arginina koji je prisutan kod normalnih životinja.

Primena DNK testa zasnovana na lančanoj reakciji umnožavanja DNK (PCR) i analizi polimorfizma restrikcionih fragmenata (RFLP) pruža nam mogućnost određivanja normalnog i mutiranog alela, a na taj način i detektovanje zdravih životinja (C/C), osetljivih na stres (T/T) i heterozigotnih nosioca (C/T), (Stevanović i sar., 2000). Izolacija DNK koja služi za identifikaciju PSS-a, po standardnoj proceduri vrši se iz leukocita, međutim zbog teškoća prilikom uzimanja krvi kod svinja, razvijena je nova tehnika za izolaciju DNK iz bulbusa dlake svinja. Osetljivost detekcije sa DNK izolovanom iz bulbusa u odnosu na izolaciju iz leukocita iznosi 75% (Popovski i sar., 2002).

Navedenim molekularnim metodama vrlo efikasno, pre uvođenja životinja u priplod možemo identifikovati sve heterozigotne nosioce stres sindroma i eliminisati ih iz populacije.

## Zaključak

Razvoj rekonbinantne DNK tehnologije omogućio je rad na mapiranju gena svih živih organizama pa samim tim i domaćih životinja. Danas smo u mogućnosti da saznamo i detektujemo veliki broj naslednih činioca koji utiču na pojavu osobina koje želimo da unapredimo selekcijom. Postupkom selekcije ne stvaramo nove gene već utičemo na promene u njihovoj frekvenciji tako što povećavamo učestalost poželjnih a smanjujemo učestalost nepoželjnih gena. Selekcija bazirana na markerima (MAS) već postaje sastavni deo odgajivačkih programa razvijenih zemalja a sve u cilju povećanja ekonomske vrednosti i kvaliteta animalnih proizvoda.

## Literatura

1. Alexander, L.J., Stewart, A.F, Mackinlaz, A.G., Kapelinskaya, T.I. Tkach, T.M., Gorodetski, S.I. (1988): Isolation and characterisation of bovine - casein gene. Eur. J. Biochem. 178, 395-401.
2. Barroso, A., S. Dunner, Canon J. (1998): Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C, and E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). J. Anim. Sci. 76:1535-1538.
3. Biochard, D., Coquereau J., Amigues, Y., Mezec, P. (1994): Station de Gene-

- tique Quantitative et Applique, INRA 257, 6 ref., France.
4. Ćirić, M., Jovanović, S., Stojić, P., Nemes, Ž., Jakovljević, G. (1998): BLAD faktor u populaciji Holštajn-frizijskih goveda, Zbornik naučnih radova, Radovi sa XII savetovanja agronoma, veterinara i tehnologa, 343-349.
  5. Groenen, M.A. M., Dijkhof, R. J. M., Verstege A. J. M., and J. J. van der Poel. (1993): The complete senquence of the gene encoding bovine s2- casein. Gene, 123, 187-193.
  6. Ferretti, L., Leone, P., Sgaramella. V. (1990): Long range restriction anaysis of the bovine casein genes. Nucleic Acids Res. 18:6829.
  7. Davis, G.P. and De Nise, S. K. (1998): The impact of genetic markers on selection. J. Anim. Sci., 76, 2549-2559.
  8. Medrano, J.F., Aguilar-Cordova, E. (1990): Genotzping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. Anim. Biotechnology. Vol. 1, 73-77.
  9. Mercier J. C. and Jean- Luc Vilotte (1993): Structure and Funcion Milk Protein. J. Dairy Sci. 76: 3079-3098.
  10. Nanotek, M. (2000): Identifikacija mutacije BLAD u bydla metoda PCR-RFLP. Biuletyn - Instytut Zootechniki., 38: 4, 29-33 6 ref.
  11. Popovski, Z. T., B., Tanaskovska, Porchu K., Vuković V., Andonov, S., Palaševski, B. (2002): New approach in the detection of porcine stress syndrome. Biotehnologija u stočarstvu. 18 (5-6), 73-80.
  12. Shuster, D. E., Kehrl, M.E., Jr. Ackerman, M.R., Gilbert, R.O. (1992): Identification and prevalence of a genetic defect that causes leucocyte adhesion deficiency in Holstain cattle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 9225-9229.
  13. Stevanović Milena, Jelena Đurović, Tamara Rajć (2000): Genetički markeri i selekcija osobina od ekonomskog znacaja. Zbornik naučnih radova, Radovi sa XIV savetovanja agronoma, veterinara i tehnologa, vol. 6 : 359-366.
  14. Stevanović Milena, Jelena Đurović, Milka Sokolović (2001): Odredjivanje genetičkih varijanti gena za proteine mleka primenom molekularno genetičkih metoda. Biotehnologija u stočarstvu. 17 (1-2), 31-37.
  15. Velmala, R. Vilkk, J., Elo, K., Maki-Tanila, A. (1995): Casein haplotzpes and their association with milk production traits in the Finnish Ayrshire cattle. Animal Genetics., Vol. 26, 419-425.
  16. Zsolnai, A., Fesus, A. (1996): Simoltaneous analysis of bovine -casein and BLAD alleles by multiplex PCR followed by parallel digestion with two restriction enzymes. Animal Genetics., 27, 207-209.

UDC:636.082.23 : 577.21

Review paper

## THE APPLICATION OF MOLECULAR GENETICS METHODS IN SELECTION OF DOMESTIC ANIMALS

*Radica Đedović, D. Latinović, Radmila Beskorovajni,  
Ljiljana Samolovac, R. Nikolić\**

### Summary

Molecular genetics made available genetic markers as a powerful tool for genetic improvement of animal selection and production.

Genetic markers are used to estimate the association with economically important trait loci. Traits of economic interest include milk protein genetic variants, milk production, disease and stress resistance etc.

**Key words:** molekular genetics, PCR, selection, domestic animals

---

\* Radica Đedović, M.Sc., Dušan Latinović, Ph.D., Faculty of Agriculture, Zemun, Radmila Beskorovajni, M.Sc., Radiša Nikolić, M. Sc., PKB INI "Agroekonomik", Padinska Skela, Ljiljana Samolovac, M.Sc., PK "Beograd", Padinska Skela. Yugoslavia.