

UDK: 577.21
Pregledni rad

GENETIČKI MARKERI I SELEKCIJA OSOBINA OD EKONOMSKOG ZNAČAJA

*Milena Stevanović, Jelena Đurović i Tamara Rajić **

Izvod: Molekularna genetika je pružila mogućnost za poboljšanje selekcije i produkcije kod domaćih životinja primenom genetičkih markera. Primena DNK markera imala je revolucionarni uticaj na projekte mapiranja gena i razvoj animalne genetike. Istraživanja su usmerena na identifikaciju gena odgovornih za variranje osobina, kao i na detekciju genetičkih markera koji se mogu koristiti u programima ukrštanja i selekcije.

Tehnologija genetičkih markera, kao što je selekcija vezana za markere (MAS), identifikacija pedigreea i genska introgresija, mogu se primeniti u oblasti selekcije kod stoke. Selekcija vezana za markere (MAS) koristi informacije o genetičkim markerima za predviđanje produkcionog potencijala i omogućuje dodatne informacije za poboljšanje efikasnosti selekcije. Cilj je genetičko usavršavanje selekcije životinja i njihove produkcije. Zbog toga se genetički markeri vrlo intenzivno koriste za procenu vezanosti sa genima koji imaju uticaj na osobine od ekonomskog značaja. Ove osobine uključuju genetički uslovljene varijante proteina mleka, otpornost na bolesti i stres, kao i osobine koje utiču na kvalitet mesa, rast i osobine karakasa. Primena selekcije bazirane na tehnologiji markera omogućuje maksimalno poboljšanje ekonomske vrednosti kod domaćih životinja.

Ključne reči: genetički markeri, selekcija, osobine od ekonomskog interesa

Uvod

Veliki broj generacija selektivnog ukrštanja neophodan je da bi se poboljšale osobine od ekonomskog značaja kod domaćih životinja. U svakoj generaciji, životinje sa osobinama najboljeg kvaliteta korišćene su u procesu ukrštanja. To je iz godine u godinu dovodilo do poboljšanja osobina od ekonomskog značaja, ali bez znanja o genima koji su uključeni u determinaciju ovih osobina, njihovom nasleđivanju i međusobnim interakcijama. Do skoro je selektivno ukrštanje bilo jedini način za poboljšanje genetičkih karakteristika kod domaćih životinja, među-

* Milena Stevanović, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Vojvode Stepe 444a, Beograd, Tamara Rajić, istraživač saradnik, IMGGI, Jelena Đurović, istraživač, IMGGI, Beograd.

tim selektivni programi bazirani na kvantitativnoj genetici pokazali su svoju ograničenost. Od nedavno su istraživanja fokusirana na identifikaciju gena odgovornih za varijabilnost kvantitativnih osobina i detekciju genetičkih markera koji se mogu primeniti u programima selekcije i ukrštanja. Selekcija vezana za markere (MAS) postala je moćno sredstvo za genetičko usavršavanje selekcije životinja i njihove produkcije (Davis et al., 1998).

Genetički markeri su polimorfne DNK sekvence koje služe za obeležavanje (markiranje) određenih tačaka na hromozomima. Genetički markeri se koriste za mapiranje genoma, a pošto su polimorfni, oni se koriste i za procenu vezanosti sa genima koji imaju uticaj na osobine od ekonomskog značaja. Ove osobine uključuju genetičke varijante proteina mleka i produkcije mleka, otpornost na bolesti i stres, reproduktivne osobine, kao i kvalitet mesa, rast i osobine karakasa.

Genetički uslovljene varijante proteina mleka: veza između genetičkih markera i produkcije mleka

Pokazano je da genetički uslovljene varijante κ -kazeina i β -laktoglobulina imaju značajan uticaj na prerađivačke osobine mleka, uključujući prinos mleka, sadržaj masti i proteina, kao i vreme sirenja (Shaar, et al., 1985; Aleandri et al., 1990; Medrano et al., 1990; Bovenhius, et al. 1992; Velmala et al., 1995; Sabour et al., 1996).

Kazeini čine glavnu komponentu proteina mleka kod krava i oni čine 80% svih proteina prisutnih u mleku (Alexander et al., 1988). Pokazano je da specifične genetičke varijante kazeina imaju efekat na kvalitet sira (Medrano et al., 1990). Postojanje polimorfizma je po prvi put pokazano u genu za κ -kazein goveda, tako da su detektovana dva najčešća alela označena kao alel A i alel B, pri čemu B alel ima značajno povoljniji efekat na kvantitet i kvalitet mleka i mlečnih prerađevina (Alexander et al., 1988; Medrano et al., 1990; Velmala et al., 1995).

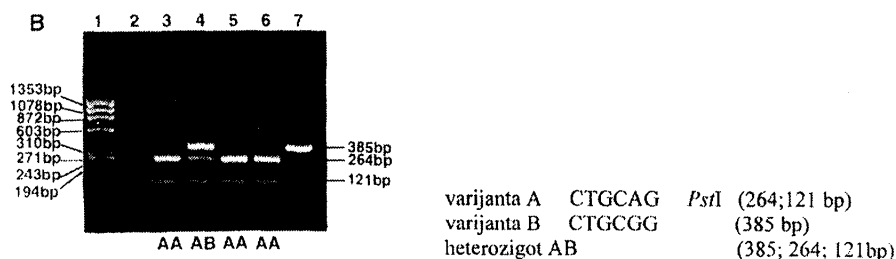
Takođe, u literaturi je prihvaćeno mišljenje da genetičke varijante β -laktoglobulina imaju veliki uticaj na sastav mleka i njegove proizvodne sposobnosti, uključujući i prinos sira dobijenog iz mleka. Genotip BB je povezan sa povećanim sadržajem masti i kazeina u mleku i ovaj genotip je poželjniji kod krava čije se mleko koristi za pravljenje sireva (Medrano et al., 1990; Sabour et al., 1996).

Genetičke varijante κ -kazeina i β -laktoglobulina mogu se odrediti primenom DNK testa koji je baziran na metodi lančanog umnožavanja DNK (PCR) i polimorfizmu restrikcionih mesta (RFLP) (Tabela 1). Test se zasniva na amplifikaciji specifičnih regiona koji sadrže polimorfne sekvence u genima za κ -kazein i β -laktoglobulin i kasniju obradu dobijenih fragmenata restrikcionim enzimima (Figura 1). Na osnovu profila fragmenata dobijenih nakon digestije restrikcionim enzimima moguće je pouzdano određivanje genotipova za κ -kazein i β -laktoglobulin (Stevanović et al., 1999).

Tab. 1. Genetički markeri i produkcija i kvalitet mleka

GENETIČKI MARKER	GENETIČKA VARIJANTA	TEST	RESTRIKCIONI ENZIM
gen za κ -kazein	A i B	PCR-RFLP	<i>PstI</i>
gen za β -laktoglobulin	A i B	PCR-RFLP	<i>HaeIII</i>

FIGURA 1:



Primena testa za određivanje genetičkih varijanti gena za κ -kazein i β -laktoglobulin zasnovanog na PCR-RFLP metodi omogućuje brzo i efikasno utvrđivanje varijacija ovih gena, bez obzira na starost i pol životinja. Primenom testa za određivanje genetičkih varijanti gena za κ -kazein i β -laktoglobulin na životinjama uključenim u programime selekcije i ukrštanja moguće je povećati učestalost poželjnih alela.

Genetički markeri i otpornost na bolesti i stres

Blad

BLAD (Bovine Leucocyte Adhesion Deficijency) je monogensko, autozomalno, recesivno, letalno oboljenje Holštajn-Frizijske rase goveda, koje je opisano 1989. godine (Kehrli et al.,1990). Simptome ove bolesti predstavlja izuzetno smanjena otpornost organizma na različite oblike infekcija. Obolela goveda su podložna infekcijama koje se vraćaju nakon konvencionalnog lečenja, tako da goveda obično umiru pre dostizanja polne zrelosti, što predstavlja izuzetno veliki problem u odgajivačkim stanicama. U molekularnom pogledu, bolest je uzrokovana tačkastom mutacijom u CD18 genu za površinski glukoproteinski receptor leukocita. Ovaj receptor je neophodan za migraciju neutrofila kroz vaskularni endotelijum u ekstravaskularni prostor, što je važno za uspešan imuni odgovor (Arnaut et al.,1990). Mutacija dovodi do zamene aminokiseline (D128G) u okviru ovog proteina što dovodi do njegove disfunkcije (Takahashi et al., 1987). Posledica je umanjena otpornost životinja prema infektivnim bolestima.

Svi identifikovani BLAD nosioci su potomci jednog bika ili njegovih bliskih rođaka, koji je zbog svojih izuzetnih karakteristika korišćen u programu ukrštanja radi genetskog unapređenja proizvodnje mleka. Međutim, poboljšanje produktivnosti pratilo je širenje BLAD mutiranog recesivnog alela, pa je ukrštanje potomaka

ovog bika dovelo do pojave mutiranog alela u homozigotnom stanju i do rađanja obolelih grla (Shuster et al., 1992). Dosadašnji rezultati ukazuju da je frekvencija mutiranog alela različita u različitim zemljama. Najveća frekvencija od 26.6% nađena je u Danskoj (Jorgensen et al., 1993), a najmanja u Mađarskoj 8.33% (Fesus et al., 1995). Prvi rezultati koji su dobijeni u našoj zemlji ukazuju da učestalost mutiranog alela iznosi: kod mladih bikova (23 uzorka) 13,04% i kod bikovskih majki (17 uzoraka) 5,88% (Ćirić et al., 1998).

Zbog problema koje BLAD izaziva u zapaštima, u svetu se od 1992. godine počela primenjivati analiza koja omogućava detekciju mutiranog alela. Da bi se omogućila kontrola ovog genetičkog defekta primenjuje se DNK test, zasnovan na reakciji lančanog umnožavanja DNK (PCR) i analizi polimorfizma restrikcionih fragmenata (RFLP), koji omogućava određivanje normalnog i mutiranog alela, a samim tim i identifikaciju zdravih životinja (TL), bolesnih (BLAD), kao i životinja koje su heterozigotni nosioci (BL) (Tabela 2). Ispitivanje životinja primenom DNK testa omogućava uzgajivačima uvid u zastupljenost ovog alela u njihovim populacijama, kao i brzo i efikasno detektovanje životinja koje su heterozigotni nosioci mutacije, u cilju njihovog isključivanja iz programa ukrštanja. Primena PCR-RFLP testa je od izuzetnog značaja jer obezbeđuje adekvatnu meru zaštite od gubitaka nastalih zbog rađanja obolelih jedinki.

Tab. 2. Mutacija u CD18 genu i otpornost na bolesti

OSOBIŃA	POVEZANOST SA GENETIČKIM MARKEROM	MUTACIJA	GENETIČKE VARIJANTE	TEST
BLAD	CD18	D128G	BLAD (oboleo) BL (heterozigotni nosilac) TL (zdrav)	PCR-RFLP

Stresni sindrom svinja

Maligna hipertermija, poznatija kao stresni sindrom svinja, je nasledno, autozomalno, recesivno oboljenje koje se javlja kod pojedinih selekcionisanih rasa svinja. Osnovna manifestacija ovog sindroma je iznenadno uginuće izazvano stresom (loši uslovi gajenja, transport, parenje) koje je praćeno pojavom bledog i vodnjikavog mesa kod svinja koje su osetljive na stres (Fujii et al., 1991). Uginuće se javlja kao posledica nekontrolisanih kontrakcija skeletne muskulature koje su praćene hipertermičkim i hipermetaboličkim reakcijama. Maligna hipertermija se kod svinja osetljivih na stres može indukovati i udisanjem gasnog anestetika halotana.

Pokazano je da maligna hipertermija nastaje kao posledica tačkaste mutacije u genu za rianodinski receptor. Ova mutacija (zamena citozina timinom na poziciji 1843) dovodi do promene aminokiseline, tako da se na poziciji 615 u rianodinskom receptoru kod svinja osetljivih na stres nalazi cistein umesto arginina koji je prisutan kod normalnih životinja (Fujii et al., 1991). Smatra se da su manifestacije koje se javljaju kod svinja podložnih malignoj hipertermiji posledica poremećaja u reguli-

sanju koncentracije intracelularnog kalcijuma u skeletnoj muskulaturi, nastalih usled izmenjene funkcije mutiranog rianodinskog receptora.

Analiza sekvence gena za rianodinski receptor je pokazala da mutacija na poziciji 1843 dovodi do ukidanja mesta koje prepoznaje restrikcioni enzim *HinPII* (Fujii et al., 1991). To otvara mogućnost primene neinvazivnog DNK testa zasnovanog na lančanoj reakciji umnožavanja DNK (PCR) i analizi polimorfizma restrikcioni fragmenata (RFLP). Ovaj DNK test omogućava pouzdano određivanje normalnog i mutiranog alela, a samim tim i identifikaciju zdravih svinja (C/C), svinja osetljivih na stres (T/T), kao i heterozigotnih nosioca (C/T) (Tabela 3).

Tab. 3. Mutacija u *ryr1* genu i podložnost stresu

OSOBI NA	POVEZANOST SA GENETIČKIM MARKEROM	MUTACIJA	GENETIČKE VARIJANTE	TEST
stresni sindrom svinja	R _{YR1} receptor	R615C	T/T (osetljive na stres) T/C (heterozigotni nosilac) C/C (zdrava jedinka)	PCR-RFLP

Osnovna prednost PCR-RFLP metode, u odnosu na halotanski test, leži u mogućnosti detektovanja heterozigotnih nosioca. PCR-RFLP je jedini pouzdan test koji se može efikasno primeniti za detekciju normalnog i mutiranog alela u *R_{YR1}* genu, a samim tim i identifikaciju zdravih i svinja osetljivih na stres, kao i heterozigotnih nosioca koji nakon ukrštanja mogu dati potomke osetljive na stres. Ovaj test pruža odgajivačima mogućnost da heterozigotne nosioce unapred isključe iz programa selekcije i ukrštanja i time spreče rađanje potomstva osetljivog na stres.

Kvalitet mesa, rast i osobine karkasa

Pri uzgajanju životinja u cilju proizvodnje mesa velika pažnja je usmerena na proučavanje genetičkih markera koji su povezani sa povećanjem mišićne mase (Stevanović et al., 2000). Kod životinja koje se gaje u tu svrhu kao što su goveda, svinje i ovce, broj miofibrila je povezan sa kapacitetom rasta. Izgleda da broj mišićnih vlakana pri rođenju određuje maksimalni kapacitet rasta mišićne mase (Soumillion et al., 1997). Miogenin (MYOG) po svemu sudeći ima ključnu ulogu u diferencijaciji mišića pa je s tim u vezi proučavana povezanost između genetičke varijacije u MYOG lokusu svinje i karakteristika rasta (Soumillion et al., 1997). Takođe, ustanovljeno je da su i neki drugi markeri povezani sa rastom i osobinama karkasa (Beever et al., 1990; Freking et al., 1998) kvalitetom i produkcijom mesa (Soumillion et al., 1997; Gerbens et al., 1997) kao i dnevnim prirastom (Clamp et al., 1997). Za analizu nekih od pomenutih markera razvijeni su brzi PCR-RFLP testovi koji omogućavaju proučavanje povezanosti sa karakteristikama rasta.

Zaključak

Razvoj tehnologije DNK markera imao je revolucionarni uticaj na mapiranje gena, a uopšte i na animalnu genetiku. Moderna animalna genetika će pomoći

naučnicima da identifikuju gene koji su uključeni u kontrolu animalne produkcije i da razumeju mehanizme koji imaju ulogu u njihovoj aktivnosti. Glavno dostignuće je pomoć u planiranju veštačke selekcije.

Istraživanja na DNK nivou usredsređena su na identifikaciju gena odgovornih za varijabilnost kvantitativnih osobina i detekciju genetičkih markera koji se mogu koristiti pri selekciji i ukrštanju. Selekcija bazirana na tehnologiji markera uspešno se primenjuje u uzgajivačkim programima u nekoliko zemalja i u budućnosti ova tehnologija bi trebalo da postane sastavni deo tradicionalne selekcije i uzgajivačkih programa, kako bi se maksimalno povećala ekonomska vrednost populacija domaćih životinja.

Literatura

1. Aleandri, R., Butassoni, L.G., Schneider, J.C., Caroli, A., Davoli, R. (1990): The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. *J. Dairy Science*. Vol. 73, 241-255.

2. Alexander, L.J., Stewart, A. F., Mackinlaz, A.G., Kapelinovskaya, T.I., Tkach, T.M., Gorodetski, S.I. (1988): Isolation and characterisation of the bovine κ -casein gene, *Eur. J. Biochem*. Vol 178, 395-401.

3. Arnaut, M.A.(1990): Leucocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunology Review* 114, 145-180.

4. Beever, J.E., George, P.D., Fernando, R.L., Stormont, C.J. and Lewin H.S. (1990): Associations between genetic markers and growth and carcass traits in a paternal half-sib family of Angus cattle. *Journal of Animal Science*, 68, 337-344.

5. Bovenhuis, H., Van Arendonk, J.A.M., Korver, S. (1992): Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits., *J. Dairy Science*. Vol 75, 2549-2559.

6. Clamp P.A., Beever J.E, Fernando R.L., McLaren D.G. and Schook L.B. (1992): Detection of linkage between genetic markers and genes that affect growth and carcass traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 70, 2695-2706.

7. Ćirić M., Jovanović S., Stojić P., Nemeš Ž., Boroš I., Jakovljević G. (1998): BLAD faktor u populaciji Holštajn-frizijskih goveda, *Zbornik naučnih radova, Radovi sa XII savetovanja agronoma, veterinara i tehnologa*, 343-349.

8. Davis, G.P. and DeNise, S.K. (1998): The impact of genetic markers on selection. *Journal of Animal Science*, 76, 2331-2339.

9. Fesus, L., Zsolnai, A. (1995): BLAD in Hungarian-Friesian cattle, *Hung. Agric. Res.*, 2.

10. Freking, B.A., Keele, J.W., Nielsen, M.K. and Leymaster, K.A. (1998): Evaluation of the bovine callipyge locus: II Genotypic effects of growth, slaughter and carcass traits. *Journal of Animal Science*, 76, 2549-2559.

11. Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., DeLeon, S., Khanna, V.K., Weiler, J.E., O'Brien, P.J. and McLennan, D. (1991): Identification of the mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253, 1180-1190.

12. Gerbens, F., Rettenberg, G., Lenstra, J.A., Veerkamp, J.H. and tePas, M.F.W. (1997): Characterisation, chromosomal localisation and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene. *Mammalian Genome*, 8, 328-332.
13. Jorgensen, C.B., Agerhallm, J.S., Pedersen, J., Thomsen, P.D.(1993): Bovine leucocyte adhesion deficiency in Danish Holstein-Fresian cattle, *Acta vet. scand.*, 34:231-236
14. Kehrlı, M.E., Schmalstieg, F.E., Anderson, D.C, Van der Maaten, M.J., Hughes, B.J., Ackermann, M.R., Wiehelmsen, C.L., Brown, G.B., Stevens, M.G and Whetsone, C.A. (1990): Molecular definition of bovine granulocytopathy syndrome: Identification of deficiency of the Mac-1 (CD116/CD18) glycoprotein. *Am.Jour. of Veterinary Research* 51, 1826-1836.
15. Medrano, J.F., Aguilar-Cordova, E. (1990): Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification, *Animal Biotechnology*. Vol. 1, 73-77.
16. Schaar, J., Hansson, B., Patterson, H. (1985): Effects of genetic variants of κ -casein i β -lactoglobulin on chesse making. *J. Dairy Res.*. Vol. 52: 429.
17. Shuster, D.E., Kehrlı, 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.
18. Sabour, M.P.,Lin, C.Y., Lee, A.J., McAllister, A.J. (1996): Association between milk protein genetic variants and genetic values of Canadian Holstein bulls for milk yield traits. *J. Dairy Sci* 79:1050-1056.
19. Soumillion, A., Erkens, J.H.F., Lenstra, J.A., Rettenberg, G. and tePas, M.F.W. (1997). Genetic variation in the porcine myogenin gene locus. *Mammalian Genome*, 8, 564-568.
20. Stevanović M., Đurović J., Terzin T., Mirković N., Stanulović V., Rajić T. (1999): Primena molekularno bioloških postupaka u analizi genetičkih varijanti κ -kazeina i β -laktoglobulina kod goveda. *Zbornik radova-Prvi simpozijum iz oblasti veterinarske nauke i prakse*: 161-164.
21. Stevanović M, Stanojčić S., Đurović J., Verbić V. (2000): Molecular marker technologies and selection for the traits of economic interest., *Biotechnology in animal breeding*, in press.
22. Takahashi, K., Miyagawa, K., Abe, S., Kurosawa, T., Sonoda, M., Nakade, T., Nagahata, H., Noda, H., Chihaya, Y. and Isogai, E. (1987): Bovine granulocytopathy syndrome of Holstein-Friesian calves and heifers. *Japanese Journal of Veterinary Science* 49, 737-736.
23. Velmala, R., Vilkki, J., Elo, K., Maki-Tanila, A. (1995): Casein haplotypes and their association with milk production traits in the Finnish Ayrshire cattle, *Animal Genetics.*. Vol. 26, 419-425.
24. Zsolnai, A., Fesus, A. Simoltaneous analysis of bovine κ -casein and BLAD alleles by multiplex PCR followed by parallel digestion with two restriction enzymes.(1996): *Animal Genetics.*, Vol. 27, 207-209.

UDC: 577.21
Review paper

GENETIC MARKERS AND SELECTION OF THE ECONOMICALLY IMPORTANT TRAITS

*Milena Stevanović, Jelena Đurović i Tamara Rajić **

Summary

Molecular genetics made available genetic markers as a powerful tool for genetic improvement of animal selection and production. The development of DNA-based markers has had a revolutionary impact on gene mapping and animal genetics. The research is focused on the identification of the genes responsible for the variability of traits and detection of the genetic markers useful for selection and crossbreeding programs.

Genetic marker technologies, such as marker-assisted selection (MAS), parentage identification and gene introgression can be applied to livestock selection programs. Marker-assisted selection (MAS) is a method which uses information on the location of markers to predict production potential and to improve the efficiency of selection. The major goal is 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 and meat quality, growth and carcass traits. Selection based on marker technologies will allow maximum improvement in the economic value of domestic populations.

Key words: genetic markers, selection, economically important traits.

* Milena Stevanović, Ph. D., Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGE), Vojvode Stepe 444a, Belgrade, Yugoslavia. Tamara Rajić, MSc, IMGGE. Jelena Đurović, BSc, IMGGE, Belgrade, Yugoslavia.