

# **Caracterizarea fenotipică și genetică a rasei Sură de Stepă**

## **RAPORT DE CERCETARE 2008 (FAZA II)**

### **Obiective:**

- 1. Stabilirea loturilor de animale analizate;**
- 2. Documentație de specialitate, elaborarea de programe biometrice aplicative;**
- 3. Alcătuire bazei de date, definitivare protocoale experimentale;**
- 4. Caracterizarea fenotipică a rasei Sură de Stepă;**
- 5. Estimarea indicatorilor statistici și a parametrilor genetici;**
- 6. Stabilirea protocoalelor în vederea determinării markerilor moleculari (genetici și biochimici).**

***Proiectul de cercetare urmărește monitorizarea nucleului de rasă Sură de Stepă din Moldova, în vederea caracterizării ei din punct de vedere fenotipic și genetic, date care vor fi utilizate pentru conservarea rasei.***

### **Activitățile desfășurate în cadrul proiectului de cercetare pentru etapa 2008 au vizat:**

- Identificarea și înregistrarea exemplarelor și a loturilor luate în studiu;
- Măsurătorilor și determinărilor specifice;
- Elaborarea modelelor experimentale, documentație de specialitate pentru adoptarea modelelor biometrice de studiu;
- Înregistrări specifice în vederea alcătuirii bazei de date;
- Elaborarea documentației de specialitate în vederea prelucrării bazei de date înregistrate;
- Analiza caracterelor morfologice și de producție, (determinarea dezvoltării corporale pe bază de măsurători și aprecierea conformației prin descrierea lineară, controlului producției de lapte, gestionarea datelor privind originea, monte, fătările, produșii obținuți, ieșirile și intrările în nucleul monitorizat);
- Analiza însușirilor de reproducție;
- Estimarea valorilor medii și ale variabilității, calcularea testelor de semnificație;
- Estimarea eritabilității, repetabilității corelațiilor fenotipice, genotipice și de mediu;
- Elaborarea de modele experimentale pentru stabilirea individualității exemplarelor;
- Stabilirea protocoalelor în vederea determinării markerilor moleculari (genetici și biochimici).

Importanța protecției și conservării resurselor genetice animale în toate statele lumii, rezidă din preocuparea permanentă a Organizației Națiunilor Unite pentru Agricultură și Alimentație, FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) prin întâlniri anuale cu specialiștii nominalizați din fiecare țară și numeroase publicații elaborate periodic prin **IDAD** (Informative for Domestic Animal Diversity) cum ar fi: Lista roșie pentru animale și plante amenințate la scară mondială; Strategia globală și managementul resurselor genetice a animalelor de fermă; Principalele linii directoare pentru dezvoltarea planurilor de gestiune a resurselor genetice la nivel național. Având în vedere că România este semnatară în 1992 a **Convenției ONU pentru biodiversitate biologică**, și alinierea legislației naționale cu cea internațională, suntem nevoiți să revedem strategia conservării resurselor genetice la nivel național.

Agrobiodiversitatea este un element esențial al biodiversității mondiale. Mai mult de 75 % din producția agricolă alimentară mondială, provine de la 25 specii vegetale și animale domestice. Gestiunea și modificările Resurselor Genetice în cadrul acestor specii sunt indispensabile și vin în întâmpinarea asigurării securității alimentare. Presiunea pentru creșterea producției alimentare, productivității și durabilității la nivel mondial este puternică. **Identificarea, obținerea și dezvoltarea ulterioară a materialului genetic vegetal și animal**, care duc la o înaltă productivitate și o bună adaptare la condițiile locale, **sunt priorități mondiale** și au condus la o mișcare fără precedent a materialului genetic de folosință agricolă.

Se impune a se face un **recensământ** al *resurselor genetice animale* în această etapă. Numărul speciilor de animale domestice exploatabile în prezent este de aproximativ 40, din care 14 specii asigură 90 % din producția animală totală. Nouă din aceste 14 specii (bovine, cabaline, porcine, ovine, caprine, bubaline, păsări și curci), reprezentând aproximativ 4.000 de rase din lumea întreagă, alcătuiesc cea mai mare parte din numărul total de mamifere cunoscute pe terra. În urma unei anchete mondiale asupra a 28 de specii de animale domestice, sunt indicate 3.882 de rase din care aproximativ **880 nu au un efectiv cunoscut**, sunt **în pericol** și **tipul lor genetic poate dispărea**.

Organizația Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură (FAO), are o lungă istorie de participare la gestiunea mondială a resurselor genetice animale și a acceptat responsabilitatea de dirijor, coordonator al acțiunilor concertate pentru monitorizarea resurselor genetice a animalelor domestice. F.A.O. a lansat în 1995 un Program lărgit pentru gestiunea resurselor genetice a animalelor de fermă, pentru orice furnizează un mecanism pentru comunicare și cooperare internațională, privind gestiunea resurselor genetice animale. Elementele tehnice ale Programului mondial al FAO pune accent pe identificarea, descrierea, dezvoltarea, utilizarea și supravegherea resurselor genetice animale, conservarea resurselor unice și amenințate, formarea

și participarea populației la gestiunea resurselor genetice animale și ameliorarea comunicării prin dialog și legături internaționale pentru gestiunea resurselor genetice animale.

*Punctele cheie pentru punerea în aplicare a inventarului resurselor genetice animale naționale se face pentru fiecare specie astfel:*

1. identificarea diferitelor rase;
2. descrierea fiecărei rase;
3. evaluarea numărului de animale din fiecare rasă și evoluția efectivelor în decursul timpului;
4. caracterizarea comparativă a principalelor caractere de producție și adaptarea la principalele condiții de producție ;
5. evaluarea importanței mondiale a raselor naționale;
6. supravegherea viitoarelor modificări din interiorul rasei.

Banca de date mondială – F.A.O. asupra resurselor genetice animale este la Roma, precum și sistemul central de stocaj a informațiilor asupra resurselor genetice animale. Ea conține informații despre 4.000 rase de mamifere și păsări de crescătorie.

Informațiile conținute în Banca de date mondială de la F.A.O. și formularele pentru susținerea informațiilor FAO/UNEP(1995) și la DAD-IS sunt disponibile pentru persoanele investite să conducă inventarele naționale ale resurselor genetice animale, acestea fiind astfel încurajate să utilizeze formularele și listele de descriere de la FAO, pentru a profita de experiența organizației în acest domeniu și pentru a facilita intrarea viitoarelor informații naționale în Banca de date mondială. În plus, Banca de rase DAD-IS este disponibilă pentru o utilizare directă la nivel național, ceea ce suprimă necesitatea de a dezvolta o nouă bază de date.

Sistemul de informare și de comunicare al FAO, DAD-IS, care este dezvoltat și menținut de către FAO în atenția țărilor pentru gestionarea resurselor genetice animale, ajută instituțiile naționale responsabile în sinteza datelor fiecărei țări și distribuirea informației pentru studiul priorităților naționale, regionale și internaționale.

## ***REZULTATE OBȚINUTE***

În prezent se apreciază unanim, că societatea modernă este confruntată cu numeroase probleme esențiale pentru viitorul omului, care apar ca rezultat al disproporției dintre o explozie demografică fără precedent și resursele naturale, care în unele locuri se diminuează și se degradează rapid ca urmare a unor exploatari defectuoase. Datorită acestor fapte, a apărut ca o necesitate acută *problema conservării mediului înconjurător*, azi prezentă pe agenda de lucru a numeroase guverne și organisme internaționale.

**Rasa Sură de Stepă** pe cale de dispariție, este cuprinsă într-un program de conservare a resurselor genetice animale, fiind crescută într-un nucleu redus la Stațiunea de Cercetare și Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor – Dancu Iași.

Asupra taurinelor Sură de Stepă nu se găsesc date mai recente privind caracterele morfoproductive și valoarea genetică actuală, motiv pentru care colectivul nostru a luat în cercetare nucleul existent în Stațiunea Dancu.



***Fig. 1. Rasa Sură de Stepă S.C.D.C.B. Dancu Iași***

**Sura de Stepă** (fig.1) este o rasă neameliorată, care provine din forma de origine *Bos taurus primigenius*. Formarea rasei este în strânsă legătură cu mediul natural, la care crescătorul a contribuit foarte puțin.

La noi în țară, până spre jumătatea secolului trecut, rasa a fost preponderentă pentru ca ulterior ponderea ei să înregistreze un declin pronunțat. În prezent, se găsește sub formă de metiși cu un grad diferit de absorbție, sporadic în Delta Dunării, Moldova, un efectiv compact de 35 capete la S.C.D.C.B. Dancu județul Iași și la SC. Trei Brazi județul Neamț. Se cunosc mai multe varietăți, care au primit denumirea după numele zonei de formare: *moldovenească, transilvăneană, ialomițeană și dobrogeană*. Varietatea transilvăneană se caracterizează din punct de vedere morfologic prin dezvoltare corporală mare, urmată de varietatea moldovenească care se situează între taurinele de mărime mijlocie, având în trecut și cea mai mare răspândire în zona Moldovei.

## ***MATERIAL ȘI METODĂ***

***Cercetările s-au efectuat pe 30 vaci Sură de Stepă, la care s-au urmărit:***

- ***indicii producției de lapte pe lactații succesive (primele opt lactații);***

- indicii dezvoltării corporale la taurinele adulte;
- structura genetică intrapopulațională;
- eritabilitatea, repetabilitatea, corelațiile fenotipice și genetice între principalele caractere morfoproductive.

Datele au provenit din observații și determinări directe în arealul de existență al rasei, precum și din banca de date primare a S.C.D.C.B. Dancu - Iași și a UARZ Iași.

Toate datele au fost prelucrate statistic după un model biometric și un program elaborat în cadrul disciplinelor de Genetică animală și Tehnologia creșterii bovinelor (S.A.V.C., Statistică, Analiza Varianței și Covarianței etc, *Conf. dr. Creangă Șteofil, Conf. dr. Vasile MACIUC 2000-2003*).

### **REZULTATELE OBTINUTE ȘI DISCUȚII**

În *tabelul 1* se prezintă valorile medii și variabilitatea indicilor producției de lapte, pe lactații succesive, la rasa Sură de Stepă. După cum se constată, durata lactației totale este și durata lactației normale întrucât nu este depășită perioada de lactație de 305 zile. Cantitatea de lapte pe lactație a fost cuprinsă între 1.589,64 kg (lact. a I-a) și 2.535,43 kg în lactația a V-a care reprezintă și lactația maximă. Începând cu lactația a VI-a cantitatea de lapte scade, ca în lactația a VIII-a să atingă valoarea de 1.078.5 kg.

În prima lactație s-a realizat 62,69 % din lactația maximă, valoare care evidențiază tardivitatea rasei Sură de stepă pentru producția de lapte.

Variabilitatea producției cantitative de lapte este foarte accentuată, valorile deviației standard fiind cuprinse între  $s = 544,10$  kg lapte în lactația a I-a și 1.185,89 kg în lactația a V-a, iar a coeficienților de variabilitate între  $V\% = 36,43$  și  $V\% = 46,77$ . Variabilitatea foarte accentuată a nucleului studiat dovedește lipsa selecției după acest parametru de bază și posibilitatea ameliorării genetice prin reținerea și multiplicarea genotipurilor valoroase. Este de menționat că în nucleul studiat au existat indivizi cu o producție maximă de 4.080 kg lapte pe lactație sau de 3.080 kg.

În structura genetică a efectivului studiat au fost identificate trei grupe de semisurori paterne (*tabelul 2*) cu producții de 1.548,22 kg (cod 79009) și 1.752,33 kg (cod 79005), valori destul de reduse în ce privește cantitatea de lapte.

Se remarcă însă o bună dezvoltare corporală a grupelor genetice, cu valori pentru greutatea corporală cuprinse între 626,67 kg (cod 79005) și 549,38 kg (87027). Aceste date sunt favorabile selecției nucleului studiat în scopul ameliorării producției de carne a rasei Sură de Stepă.

Tabelul 1

*Valorile medii și variabilitatea indicilor producției de lapte,  
pe lactații succesive, la rasa Sură de Stepă*

| Specificare  | Statisticii probei | Lactație totală |          |         |          | Lactație normală |          |         |          |                  |
|--------------|--------------------|-----------------|----------|---------|----------|------------------|----------|---------|----------|------------------|
|              |                    | Durata zile     | Lapte kg | % grăs. | Kg grăs. | Durata zile      | Lapte Kg | % grăs. | Kg grăs. | Durata gestației |
| Lactația I   | n                  | 30              | 30       | 30      | 30       | 30               | 30       | 30      | 30       | 30               |
|              | $\bar{X}$          | 259,80          | 1589,64  | 4,64    | 68,94    | 259,80           | 1589,64  | 4,64    | 68,94    | 281,89           |
|              | $\pm s \bar{x}$    | 14,04           | 112,51   | 0,09    | 5,03     | 11,18            | 102,82   | 0,09    | 4,67     | 1,07             |
|              | s                  | 74,33           | 595,35   | 0,49    | 26,62    | 59,19            | 544,10   | 0,49    | 24,74    | 5,70             |
|              | V%                 | 28,68           | 36,69    | 11,24   | 39,18    | 23,74            | 36,43    | 11,21   | 37,48    | 2,02             |
|              | Min                | 90              | 360      | 3,40    | 15,00    | 90               | 360      | 3,40    | 15,00    | 269              |
|              | Max                | 450             | 2612     | 5,30    | 110,00   | 305              | 2612     | 5,30    | 107,00   | 293              |
| Lactația II  | n                  | 27              | 27       | 27      | 27       | 27               | 27       | 27      | 27       | 27               |
|              | $\bar{X}$          | 254,26          | 1699,96  | 4,65    | 67,04    | 254,26           | 1699,96  | 4,65    | 67,04    | 277,26           |
|              | $\pm s \bar{x}$    | 14,45           | 147,15   | 0,09    | 5,09     | 14,45            | 147,15   | 0,09    | 5,09     | 5,42             |
|              | s                  | 62,29           | 705,71   | 0,45    | 24,42    | 62,29            | 705,71   | 0,45    | 24,42    | 25,99            |
|              | V%                 | 27,25           | 41,58    | 9,88    | 33,43    | 27,25            | 41,58    | 9,88    | 33,43    | 9,37             |
|              | Min                | 32              | 198      | 3,70    | 10,00    | 32               | 198      | 3,70    | 10,00    | 161              |
|              | Max                | 369             | 3565     | 5,40    | 111,00   | 369              | 3565     | 5,40    | 111,00   | 296              |
| Lactația III | n                  | 20              | 20       | 20      | 20       | 20               | 20       | 20      | 20       | 20               |
|              | $\bar{X}$          | 254,80          | 2092,80  | 4,51    | 93,00    | 254,80           | 2092,80  | 4,51    | 93,00    | 284,50           |
|              | $\pm s \bar{x}$    | 15,39           | 215,08   | 0,12    | 8,76     | 15,39            | 215,08   | 0,12    | 8,76     | 1,35             |
|              | s                  | 59,61           | 833,01   | 0,49    | 33,95    | 59,61            | 833,01   | 0,49    | 33,95    | 5,08             |
|              | V%                 | 23,39           | 39,80    | 10,85   | 36,50    | 23,39            | 39,80    | 10,85   | 36,50    | 1,78             |
|              | Min                | 116             | 434      | 3,50    | 22,00    | 116              | 434      | 3,50    | 22,00    | 276              |
|              | Max                | 345             | 4080     | 5,30    | 144,00   | 345              | 4080     | 5,30    | 144,00   | 292              |
| Lactația IV  | n                  | 15              | 15       | 15      | 15       | 15               | 15       | 15      | 15       | 15               |
|              | $\bar{X}$          | 290,50          | 2082,10  | 4,62    | 91,10    | 290,50           | 2082,10  | 4,62    | 91,10    | 278,70           |
|              | $\pm s \bar{x}$    | 22,75           | 250,46   | 0,13    | 9,71     | 22,75            | 250,46   | 0,13    | 9,71     | 3,18             |
|              | s                  | 71,95           | 792,03   | 0,41    | 30,72    | 71,95            | 792,03   | 0,41    | 30,72    | 10,06            |
|              | V%                 | 24,77           | 38,04    | 8,94    | 33,72    | 24,77            | 38,04    | 8,94    | 33,72    | 3,61             |
|              | Min                | 194             | 835      | 4,10    | 45,00    | 194              | 835      | 4,10    | 45,00    | 255              |
|              | Max                | 470             | 3080     | 5,30    | 138,00   | 470              | 3080     | 5,30    | 138,00   | 292              |

**Tabelul 1 (continuare)**

| Specificare   | Statistici probei | Lactație totală |          |         |          | Lactație normală |          |         |          |                  |
|---------------|-------------------|-----------------|----------|---------|----------|------------------|----------|---------|----------|------------------|
|               |                   | Durata zile     | Lapte kg | % grās. | Kg grās. | Durata zile      | Lapte Kg | % grās. | Kg grās. | Durata gestației |
| Lactația V    | n                 | 8               | 8        | 8       | 8        | 8                | 8        | 8       | 8        | 8                |
|               | $\bar{X}$         | 285,43          | 2535,43  | 4,73    | 119,92   | 285,43           | 2535,43  | 4,73    | 119,92   | 282,00           |
|               | $\pm s \bar{x}$   | 20,76           | 448,22   | 0,21    | 25,25    | 20,76            | 448,22   | 0,21    | 25,25    | 3,20             |
|               | s                 | 54,93           | 1185,89  | 0,57    | 66,82    | 54,93            | 1185,89  | 0,57    | 66,82    | 8,48             |
|               | V%                | 19,24           | 46,77    | 12,06   | 54,01    | 19,24            | 46,77    | 12,06   | 54,01    | 3,00             |
|               | Min               | 191             | 675      | 3,70    | 32,00    | 191              | 675      | 3,70    | 32,00    | 263              |
|               | Max               | 369             | 4087     | 5,30    | 212,00   | 369              | 4087     | 5,30    | 212,00   | 287              |
| Lactația VI   | n                 | 5               | 5        | 5       | 5        | 5                | 5        | 5       | 5        | 5                |
|               | $\bar{X}$         | 226,75          | 1411,00  | 4,95    | 69,00    | 226,75           | 1411,00  | 4,95    | 69,00    | 281,33           |
|               | $\pm s \bar{x}$   | 21,04           | 201,67   | 0,15    | 9,28     | 21,04            | 201,67   | 0,15    | 9,28     | 1,66             |
|               | s                 | 42,08           | 403,35   | 0,31    | 18,56    | 42,08            | 403,35   | 0,31    | 18,56    | 2,88             |
|               | V%                | 18,55           | 28,58    | 6,28    | 26,90    | 18,55            | 28,58    | 6,28    | 26,90    | 1,01             |
|               | Min               | 175             | 818      | 4,60    | 43,00    | 175              | 818      | 4,60    | 43,00    | 282              |
|               | Max               | 278             | 1705     | 5,30    | 87,00    | 278              | 1705     | 5,30    | 87,00    | 287              |
| Lactația VII  | n                 | 3               | 3        | 3       | 3        | 3                | 3        | 3       | 3        | 3                |
|               | $\bar{X}$         | 298             | 1519,00  | 4,66    | 83       | 298              | 1519,00  | 4,66    | 83       | 276              |
|               | $\pm s \bar{x}$   | 20,75           | 270,46   | 0,13    | 9,71     | 20,75            | 270,46   | 0,13    | 9,71     | 3,18             |
|               | s                 | 71,95           | 792,03   | 0,41    | 30,72    | 71,95            | 792,03   | 0,41    | 30,72    | 10,06            |
|               | V%                | 14,77           | 18,04    | 3,94    | 13,72    | 14,77            | 18,04    | 3,94    | 13,72    | 3,61             |
|               | Min               | 254             | 835      | 4,10    | 45,00    | 254              | 835      | 4,10    | 45,00    | 250              |
|               | Max               | 350             | 1980     | 5,30    | 138,00   | 350              | 1980     | 5,30    | 138,00   | 290              |
| Lactația VIII | n                 | 2               | 2        | 2       | 2        | 2                | 2        | 2       | 2        | 2                |
|               | $\bar{X}$         | 227,77          | 1078,5   | 5,28    | 57,44    | 227,77           | 1078,5   | 5,28    | 57,44    | 275              |
|               | $\pm s \bar{x}$   | 10,75           | 268,46   | 0,13    | 9,71     | 10,75            | 268,46   | 0,13    | 9,71     | 3,18             |
|               | s                 | 71,95           | 792,03   | 0,41    | 30,72    | 71,95            | 792,03   | 0,41    | 30,72    | 10,06            |
|               | V%                | 9,77            | 12,04    | 2,94    | 10,72    | 9,77             | 12,04    | 2,94    | 10,72    | 3,61             |
|               | Min               | 194             | 875      | 5,19    | 45,00    | 194              | 875      | 5,19    | 45,00    | 254              |
|               | Max               | 260             | 1282     | 5,30    | 68,00    | 260              | 1282     | 5,30    | 68,00    | 297              |

Semnificația diferențelor a fost testată între grupele de semisurori ajungându-se la concluzia că la producția de lapte nu sunt diferențe semnificative respectiv, testul Fisher indică  $0,6431 (F) < F_{0,05} (4; 22)$ . De asemenea pentru talie, diferențele sunt nesemnificative  $1,1503 (F) < F_{0,05} (4; 22)$ . S-au constatat diferențe semnificative la caracterul greutatea corporală prezentate în tabelul 3.

Tabelul 2

*Valorile medii și variabilitatea principalelor însușiri morfoproductive, pe grupe genetice, la taurinele Sură de Stepă*

| Specificare              | UM   | Cod 79005 |           |                 |        |       |       |       | Cod 79009 |           |                 |        |       |      |      | Cod 87027 |           |                 |        |       |      |      |
|--------------------------|------|-----------|-----------|-----------------|--------|-------|-------|-------|-----------|-----------|-----------------|--------|-------|------|------|-----------|-----------|-----------------|--------|-------|------|------|
|                          |      | n         | $\bar{X}$ | $\pm s \bar{x}$ | s      | V%    | Min   | Max   | n         | $\bar{X}$ | $\pm s \bar{x}$ | s      | V%    | Min  | Max  | n         | $\bar{X}$ | $\pm s \bar{x}$ | s      | V%    | Min  | Max  |
| Durata gestației         | zile | 3         | 284,67    | 1,76            | 3,05   | 1,07  | 282   | 288   | 9         | 283,78    | 1,50            | 4,52   | 1,59  | 278  | 291  | 10        | 278,30    | 1,51            | 4,78   | 1,72  | 269  | 283  |
| Durata lactației normale | zile | 3         | 281,33    | 13,28           | 23,00  | 8,17  | 258   | 304   | 9         | 247,89    | 12,42           | 67,27  | 27,13 | 90   | 305  | 9         | 270,33    | 17,72           | 53,18  | 19,67 | 150  | 305  |
| Cantitatea de lapte      | kg   | 3         | 1752,33   | 269,80          | 467,31 | 26,66 | 1213  | 2037  | 9         | 1548,22   | 226,46          | 679,40 | 43,88 | 360  | 2296 | 9         | 1558,11   | 138,47          | 415,42 | 26,66 | 940  | 1989 |
| Conținutul în grăsime    | %    | 3         | 4,70      | 0,20            | 0,34   | 7,37  | 4,50  | 5,10  | 9         | 4,74      | 0,11            | 0,33   | 7,07  | 4,30 | 5,30 | 9         | 3,98      | 0,09            | 0,27   | 6,85  | 3,40 | 4,20 |
| Cantitatea de grăsime    | kg   | 3         | 81,10     | 10,05           | 17,40  | 21,46 | 61,00 | 91,30 | 9         | 73,00     | 10,38           | 31,14  | 42,65 | 15   | 107  | 8         | 62,44     | 5,98            | 17,95  | 28,74 | 35   | 84   |
| Înălțimea la grebăn      | cm   | 3         | 122,00    | 3,00            | 5,19   | 4,25  | 119   | 128   | 9         | 123,17    | 0,74            | 1,83   | 1,49  | 120  | 125  | 8         | 121,75    | 1,26            | 3,57   | 2,93  | 115  | 127  |
| Perimetrul toracelui     | cm   | 3         | 198,33    | 5,20            | 9,01   | 4,54  | 189   | 207   | 9         | 193,33    | 1,90            | 4,67   | 2,41  | 187  | 199  | 8         | 189,75    | 3,00            | 8,49   | 4,47  | 176  | 201  |
| Greutatea corporală      | kg   | 3         | 626,67    | 49,10           | 85,04  | 13,57 | 540   | 710   | 9         | 580,50    | 17,68           | 43,33  | 7,46  | 520  | 630  | 9         | 549,38    | 26,10           | 73,84  | 13,44 | 435  | 650  |



**Tabelul 3**

**Semnificația diferențelor la caracterul greutatea corporală între grupele de semisurori**

| Testul Fisher : 12, 0429 (F) > F <sub>0,001</sub> ( 4 ; 22 ) 6,81 *** foarte semnificativă |             |          |      |      |        |        |                 |                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------|------|------|--------|--------|-----------------|--------------------|
| Testul Tukey:                                                                              |             |          |      |      |        |        |                 |                    |
| Caracterul1                                                                                | Caracterul2 | Dif.med. | Q1   | Q2   | W1     | W2     | Semnificatia    | Pragul             |
| tg87027                                                                                    | tg79005     | 77.29    |      |      |        |        | nesemnificativa |                    |
| tg87027                                                                                    | tg79008     | 117.50   |      |      |        |        | semnificativa   | pentru pragul 0.05 |
| tg87027                                                                                    | tg79009     | 31.13    |      |      |        |        | nesemnificativa |                    |
| tg87027                                                                                    | tg86002     | 130.63   |      |      |        |        | semnificativa   | pentru pragul 0.05 |
| tg86002                                                                                    | tg79005     | 53.33    |      |      |        |        | nesemnificativa |                    |
| tg86002                                                                                    | tg79008     | 248.13   |      |      |        |        | semnificativa   | pentru pragul 0.01 |
| tg86002                                                                                    | tg79009     | 99.50    |      |      |        |        | nesemnificativa |                    |
| tg79009                                                                                    | tg79005     | 46.17    |      |      |        |        | nesemnificativa |                    |
| tg79009                                                                                    | tg79008     | 148.63   |      |      |        |        | semnificativa   | pentru pragul 0.01 |
| tg79008                                                                                    | tg79005     | 194.79   | 4.20 | 5.23 | 108.99 | 135.72 | semnificativa   | pentru pragul 0.01 |

În *tabelul 4* se prezintă valorile medii și variabilitatea dezvoltării corporale, din analiza cărora se pot rezuma următoarele:

- Vacile din nucleul studiat au avut talia medie de 122,28 cm și greutatea corporală 542,86 kg, valori care evidențiază o bună masivitate corporală. Pentru acest caracter se constată plus variante care au atins greutatea de 710,00 kg;
- Variabilitatea taliei este mai puțin accentuată, lotul analizat fiind suficient de omogen ( $s = 3,06$  cm, iar  $V \% = 2,51$ ). În schimb greutatea corporală prezintă o variabilitate mare, cu indicii de dispersie  $s = 99,38$  kg, iar  $V \% = 18,30$ ;
- Cunoașterea rezervelor de variabilitate existente, a parametrilor fenotipici și genetici, este foarte importantă în cadrul unei populații de vaci, aceasta determinând aprecierea asupra stadiului de ameliorare al acestei populații și asigură fundamentarea științifică a programelor de ameliorare și conservare genetică în perspectivă.

Tabelul 4

*Valorile medii și variabilitatea dezvoltării corporale la taurinele din rasa Sură de Stepă*

| Specificare                             | UM | n  | $\bar{X}$ | $\pm s \bar{x}$ | s     | V%    | Min    | Max    | % din talie |
|-----------------------------------------|----|----|-----------|-----------------|-------|-------|--------|--------|-------------|
| Înălțimea la grebăn                     | cm | 30 | 122,28    | 0,57            | 3,06  | 2,51  | 115,00 | 128,00 | 100,00      |
| Înălțimea la spinare                    | cm | 30 | 121,66    | 0,58            | 3,14  | 2,58  | 116,00 | 129,00 | 99,49       |
| Înălțimea la crupă                      | cm | 30 | 125,14    | 0,61            | 3,33  | 2,66  | 119,00 | 132,00 | 102,33      |
| Înălțimea la baza cozii                 | cm | 30 | 126,00    | 0,58            | 3,14  | 2,49  | 120,00 | 132,00 | 103,41      |
| Adâncimea toracelui                     | cm | 30 | 70,24     | 0,71            | 3,87  | 5,50  | 63,00  | 79,00  | 57,44       |
| Înălțimea la stern                      | cm | 30 | 51,62     | 0,74            | 4,02  | 7,79  | 41,00  | 60,00  | 42,21       |
| Lungimea oblică a corpului              | cm | 30 | 155,10    | 1,90            | 10,23 | 6,59  | 132,00 | 169,00 | 126,84      |
| Lungimea orizontală a corpului          | cm | 30 | 134,72    | 1,14            | 6,16  | 4,57  | 121,00 | 148,00 | 110,17      |
| Lungimea totală a corpului              | cm | 30 | 191,07    | 4,67            | 25,19 | 13,18 | 78,00  | 216,00 | 156,25      |
| Lungimea toracelui                      | cm | 30 | 87,21     | 0,97            | 5,25  | 6,02  | 77,00  | 99,00  | 71,31       |
| Lungimea crupei                         | cm | 30 | 49,66     | 0,51            | 2,79  | 5,62  | 44,00  | 59,00  | 40,15       |
| Lungimea capului                        | cm | 30 | 48,66     | 0,57            | 3,09  | 6,36  | 36,00  | 53,00  | 40,59       |
| Lărgimea toracelui înapoia spetelor     | cm | 30 | 47,00     | 0,64            | 3,47  | 7,39  | 41,00  | 53,00  | 38,43       |
| Lărgimea pieptului                      | cm | 30 | 41,03     | 0,54            | 2,93  | 7,14  | 35,00  | 47,00  | 33,55       |
| Lărgimea crupei la șolduri              | cm | 30 | 49,83     | 0,50            | 2,70  | 5,41  | 43,00  | 57,00  | 40,75       |
| Lărgimea crupei la artic. coxo-femorale | cm | 30 | 43,76     | 0,42            | 2,27  | 5,20  | 40,00  | 51,00  | 35,78       |
| Lărgimea crupei la ischii               | cm | 30 | 16,90     | 0,42            | 2,27  | 13,45 | 13,00  | 22,00  | 13,82       |
| Lățimea capului                         | cm | 30 | 21,79     | 0,18            | 1,01  | 4,65  | 20,00  | 23,00  | 17,81       |
| Perimetrul toracelui                    | cm | 30 | 189,00    | 2,18            | 11,75 | 6,22  | 158,00 | 207,00 | 154,56      |
| Perimetrul fluierului                   | cm | 30 | 18,07     | 0,15            | 0,82  | 4,54  | 17,00  | 20,00  | 14,77       |
| Greutatea corporală                     | kg | 30 | 542,86    | 18,45           | 99,38 | 18,30 | 390,00 | 710,00 | 443,94      |

În *tabelul 5-6 și fig. 2-7* sunt prezentate valorile coeficienților de heritabilitate, repetabilitate și corelațiilor între principalele caractere morfoproductive.

Din analiza heritabilității principalelor caractere morfoproductive se pot reține valorile mijlocii pentru cantitatea de lapte și grăsime ( $h^2 = 0,30; 0,31$ ), ceea ce dovedește o bună consolidare genetică a nucleului studiat. Același aspect rezultă și din analiza heritabilității taliei și greutateii corporale, selecția fenotipică pentru aceste caractere fiind eficientă. De menționat procentul de grăsime din lapte care are un determinism genetic ridicat ( $h^2 = 0,71$ ).

Determinarea repetată a performanțelor unui individ prelungește timpul de cunoaștere mai exactă și în consecință, timpul pentru luarea deciziei cu privire la reținerea sau respingerea lui în procesul de selecție. De aceea, pentru a beneficia de această certitudine sporită, fără a mai apela la măsurători repetate în timp în vederea stabilirii definitive a valorii animalului, se poate folosi un parametru genetic care dă indicații asupra gradului de asemănare a valorii caracterelor între o măsurătoare și alta, parametru genetic denumit *repetabilitate*. În înțeles larg, repetabilitatea se referă la manifestarea fenotipică a aceluiași caracter în diferite perioade ale vieții individuale.

Repetabilitatea caracterelor analizate dovedește aceeași bună consolidare genetică a rasei Sură de stepă și posibilitatea ameliorării printr-o selecție fenotipică. Evidențiem cantitatea de lapte și grăsime cu repetabilitate medie  $R = 0,33-0,34$  respectiv, procentul de grăsime din lapte cu repetabilitate mare  $R = 0,73$ ,

Una din problemele de bază ale studiului eredității caracterelor cantitative este cunoașterea gradului în care între două caractere există sau nu interdependență, care este pusă în evidență cu ajutorul *coeficienților de corelație*.

Referitor la corelațiile fenotipice și genetice între diferitele însușiri analizate, sunt relevate valori și semnificații diferite în funcție de caracterele analizate (*tabelul 6*). Dintre numeroasele perechi de caractere considerate, reține atenția corelațiile fenotipice și genetice pozitive și intense între producția cantitativă de lapte și cantitatea de grăsime ( $r_{pg} = 0,98-0,97$ ). Aceleași corelații pozitive și de intensitate medie se constată între producția cantitativă de lapte și însușirile de dezvoltare corporală ( $r_{pg} = 0,33 - 0,44$ ). Corelația clasică între producția cantitativă de lapte și conținutul de grăsime este negativă ( $-0,21, -0,19$ ). Corelațiile dintre durata gestației și unele însușiri de producție respectiv dezvoltare corporală sunt slabe și pozitive sau slabe și negative.

Tabelul 5

*Heritabilitatea ( $h^2$ ) și repetabilitatea (R) principalelor caractere morfoproductive, la rasa Sură de Stepă*

| Specificare              | Heritabilitatea | Repetabilitatea |
|--------------------------|-----------------|-----------------|
| Durata gestației         | 0,15            | 0,17            |
| Durata lactației normale | 0,27            | 0,29            |
| Cantitatea de lapte      | 0,30            | 0,33            |
| Procentul de grăsime     | 0,71            | 0,73            |
| Cantitatea de grăsime    | 0,31            | 0,34            |
| Înălțimea la grebăn      | 0,37            | -               |
| Perimetrul toracelui     | 0,33            | -               |
| Greutatea corporală      | 0,41            | -               |

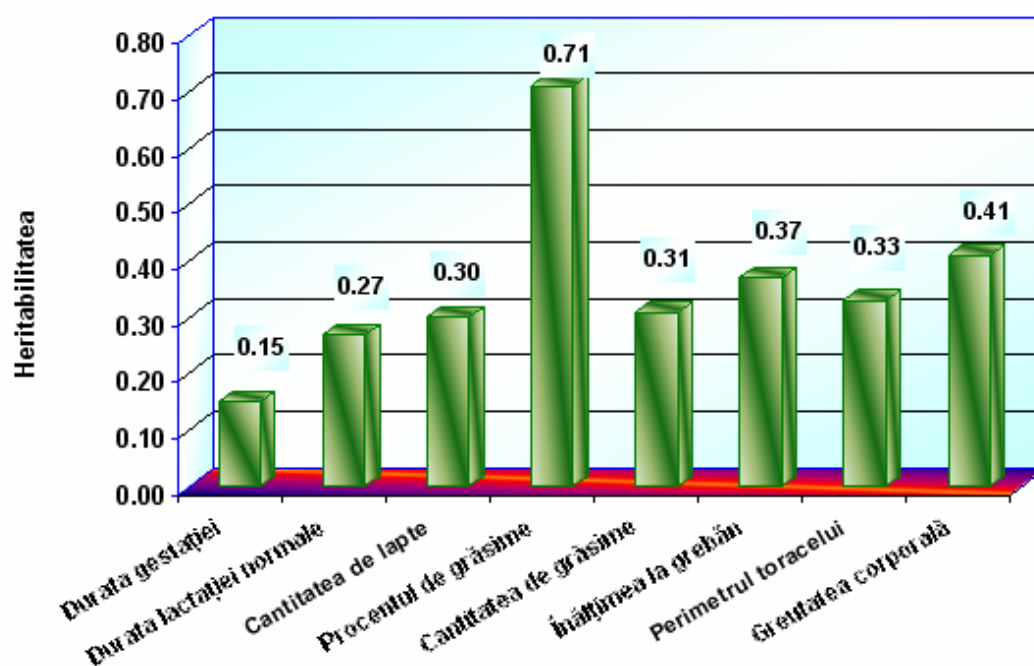


Fig. 2. Coeficientul de heritabilitate la principalele însușiri morfoproductive

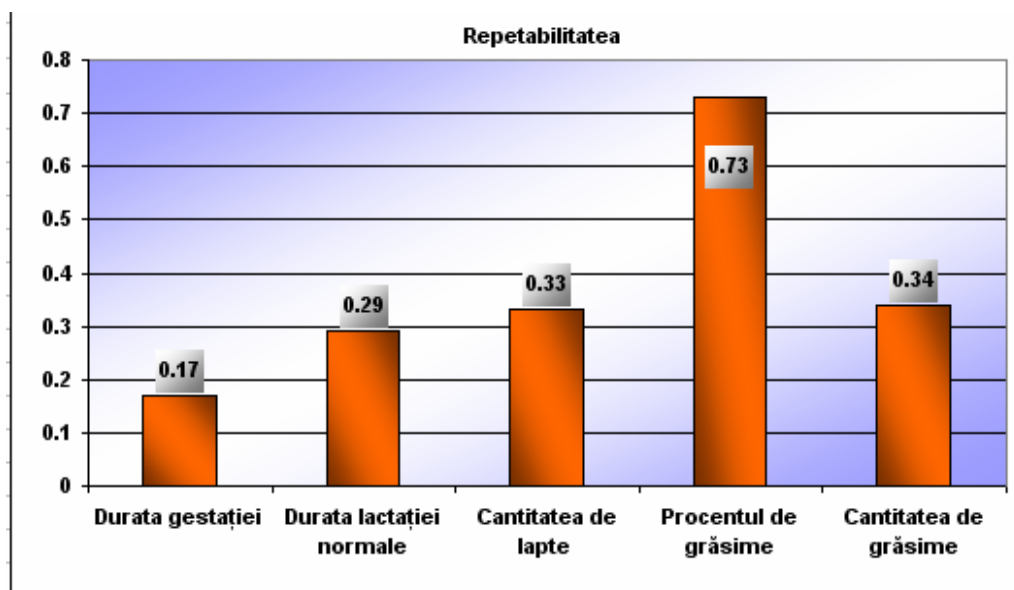


Fig. 3. Coeficientul de repetabilitate la principalele însușiri de producție

Tabelul 6

Corelații fenotipice ( $r_p$ ) și genetice ( $r_g$ ) între principalele caractere morfoproductive la rasa Sură de Stepă

| Însușirile corelate            | $r_p \pm S_{rp}$ |      | $r_g \pm S_{rg}$ |      |
|--------------------------------|------------------|------|------------------|------|
| <i>Cantitatea de lapte și:</i> |                  |      |                  |      |
| Durata gestației               | 0,18             | 0,07 | 0,25             | 0,04 |
| Durata lactației               | -0,25            | 0,03 | -0,26            | 0,05 |
| Procentul de grăsime           | -0,21            | 0,02 | -0,19            | 0,01 |
| Cantitatea de grăsime          | 0,98             | 0,01 | 0,97             | 0,03 |
| Talia                          | 0,38             | 0,06 | 0,33             | 0,01 |
| Perimetrul toracic             | 0,39             | 0,06 | 0,32             | 0,01 |
| Greutatea corporală            | 0,44             | 0,06 | 0,41             | 0,01 |
| <i>Durata gestației și:</i>    |                  |      |                  |      |
| Durata lactației               | 0,09             | 0,08 | 0,13             | 0,06 |
| Procentul de grăsime           | 0,07             | 0,08 | 0,10             | 0,07 |
| Cantitatea de grăsime          | 0,28             | 0,07 | 0,43             | 0,09 |
| Talia                          | -0,11            | 0,01 | -0,13            | 0,05 |
| Perimetrul toracic             | -0,10            | 0,07 | -0,30            | 0,04 |
| Greutatea corporală            | -0,08            | 0,09 | -0,11            | 0,02 |

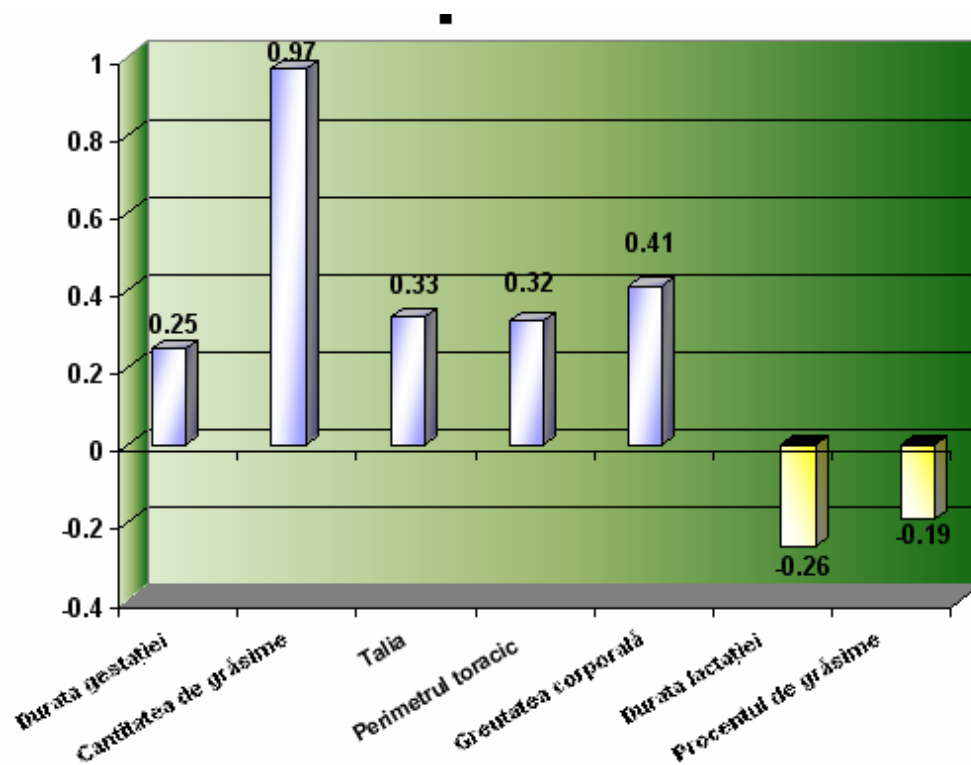


Fig.4. Corelațiile genetice între cantitatea de lapte și unele însușiri morfoproductive

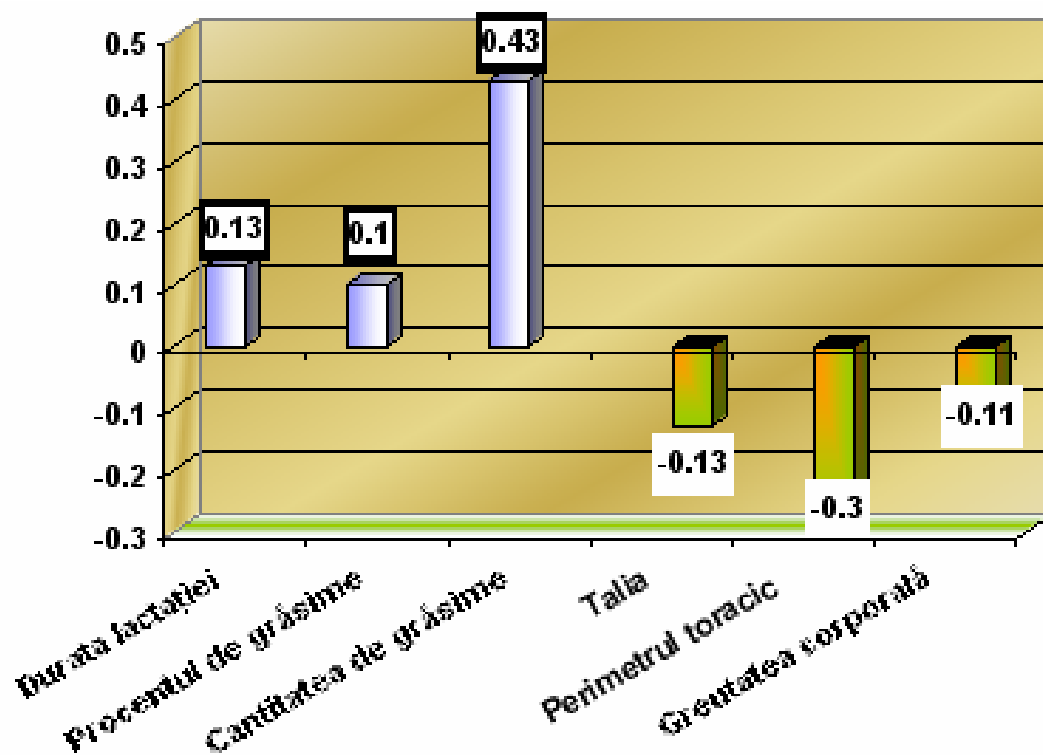


Fig. 5. Corelațiile genetice între durata gestației și principalele însușiri morfoproductive

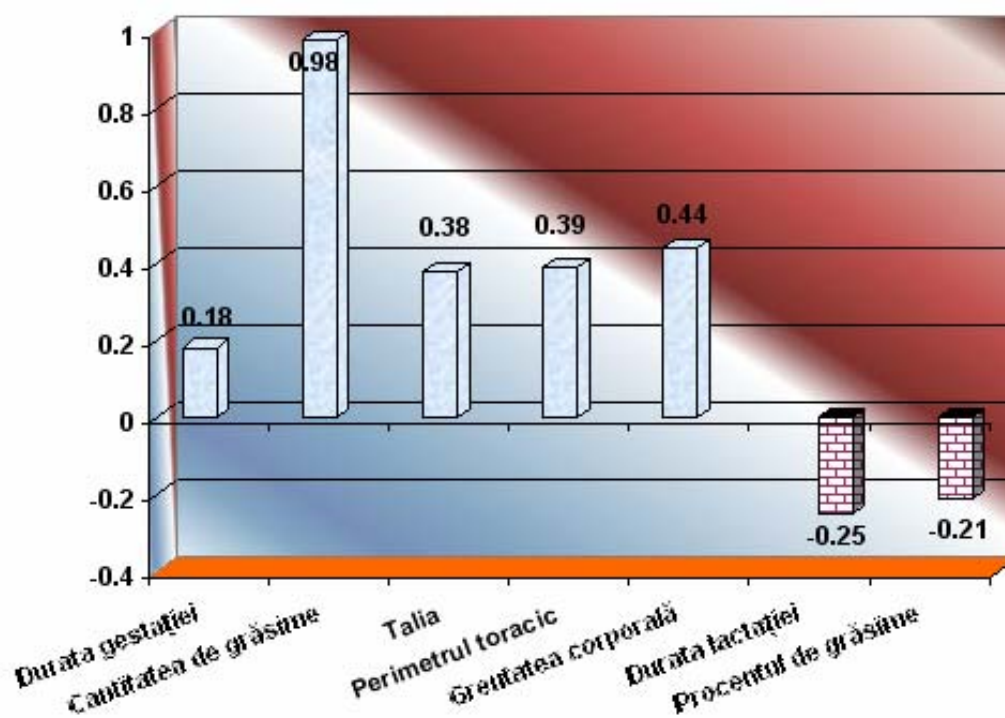


Fig. 6. Corelațiile fenotipice între cantitatea de lapte și unele însușiri morfoproductive

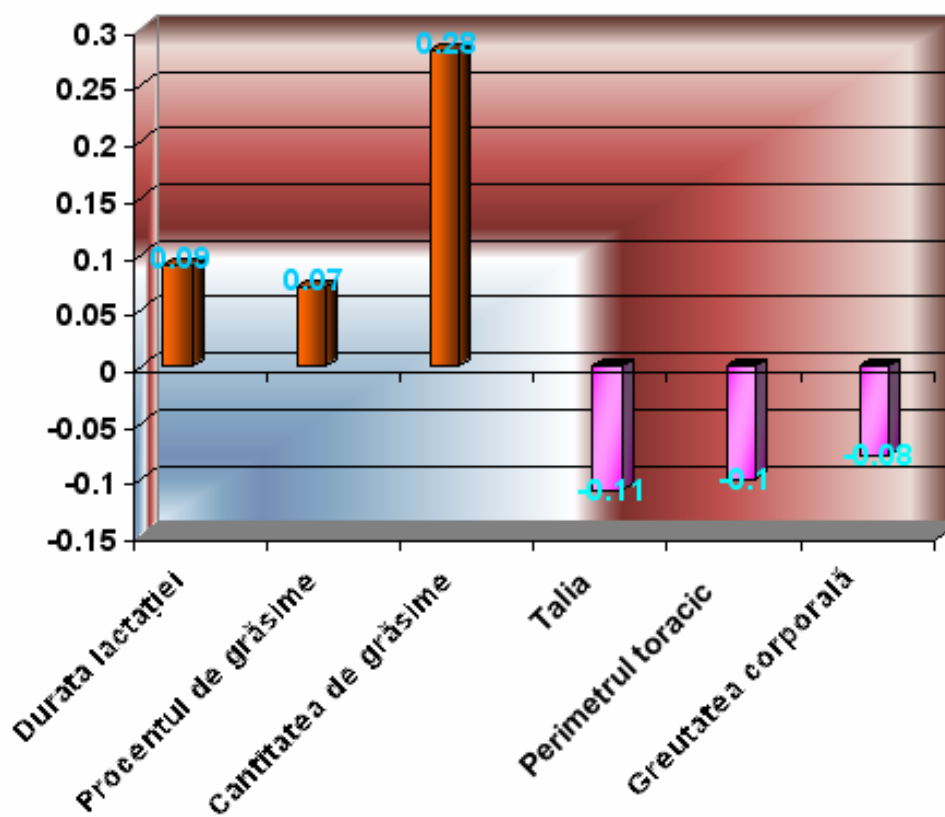


Fig. 7. Corelațiile fenotipice între durata gestației și principalele însușiri morfoproductive

## Concluzii

- ✓ Societatea modernă este confruntată cu numeroase probleme esențiale pentru viitorul omului, care apar ca rezultat al disproporției dintre o explozie demografică fără precedent și resursele naturale, care în unele locuri se diminuează și se degradează rapid, ca urmare a unor exploatare defectuoase. Datorită acestor fapte, a apărut ca o necesitate acută *problema conservării mediului înconjurător*, azi prezentă pe agenda de lucru a numeroase guverne și organisme internaționale;
- ✓ Din analiza indicilor morfoproductivi ai nucleului de rasă Sură de Stepă exploatat în ferma Dancu - Iași, rezultă valoarea genetică actuală și posibilitatea unei selecții eficiente pentru ridicarea performanțelor productive, precum și pentru o eficientă conservare a nucleelor existente. Cantitatea de lapte pe lactație a fost cuprinsă între 1589,64 kg (lact. a I-a) și 2535,43 kg în lactația a V-a care reprezintă și lactația maximă;
- ✓ Reproducătorii folosiți nu sunt testați genetic iar ascendența este necunoscută ceea ce influențează nivelul productiv al populației studiate;
- ✓ Din analiza heritabilității principalelor caractere morfoproductive se pot reține valorile mijlocii pentru cantitatea de lapte și grăsime ( $h^2 = 0,30, 0,31$ ), ceea ce dovedește o bună consolidare genetică a nucleului studiat. Repetabilitatea caracterelor analizate dovedește aceeași bună consolidare genetică a rasei Sură de stepă și posibilitatea ameliorării printr-o selecție fenotipică;
- ✓ Dintre numeroasele perechi de caractere analizate, reține atenția corelațiile fenotipice și genetice pozitive și intense între producția cantitativă de lapte și cantitatea de grăsime ( $r_{pg} = 0,98-0,97$ ). Aceleași corelații pozitive și de intensitate medie se constată între producția cantitativă de lapte și însușirile dezvoltării corporale  $r_{pg} = 0,33 - 0,44$ ;
- ✓ Nucleul de rasă Sură de stepă din ferma Dancu reprezintă un fond genetic valoros care trebuie conservat și ameliorat în direcția producției mixte carne-lapte și dezvoltat din punct de vedere numeric, pentru a se evita driftul genetic și consangvinizarea strânsă.



## ***Stabilirea protocoalelor de lucru în vederea determinării markerilor moleculari (genetici și biochimici)***

### **Tehnici utilizate pentru identificarea polimorfismelor proteinelor din lapte la nivelul expresiei genice:**

#### ***Electroforeza Verticală în Gel de Poliacrilamidă***

Tehnică a fost introdusă de Rymond și Weintraub în 1959. Utilizarea sa pe scară largă a început abia în 1964, dovedindu-se a fi cel mai potrivit mediu suport pentru separări electroforetice analitice. De atunci s-a folosit cu succes pentru separarea multor specii proteice, separarea fragmentelor de ADN și secvențiere.

Acest tip de electroforeză folosește ca suport pentru migrare gelurile de poliacrilamidă, migrarea realizându-se în sistem vertical. Ele se obțin prin polimerizarea acrilamidei și metilen-bisacrilamidei, care este indusă prin adăugarea în soluția acestor monomeri a unor agenți de polimerizare.

Polimerizarea trebuie realizată în absența oxigenului deoarece acesta inhibă formarea polimerilor. Marele avantaj al acestei metode este că mărirea porilor poate fi reglată mult mai bine și de aceea separarea este mult mai bună, acest lucru putându-se realiza prin creșterea sau scăderea concentrației soluției de monomeri.

Polimerizarea se realizează între două plăci de sticlă, de dimensiuni similare cu mărirea dorită a gelului. Între ele se introduc spațiatoare, care pot avea grosimi cuprinse între 0,75mm - 1,5mm, în funcție de grosimea dorită a gelului. Pentru a preveni scurgerea gelului dintre plăci și obținerea unei grosimi uniforme, înainte de turnare lui, placile de sticlă sunt atașate strans una de alta prin intermediul unor cleme.

Soluțiile stoc de monomeri se prepară din pudră de acrilamidă-bisacrilamidă în proporție de 29:1. Concentrațiile de gel folosite sunt în general cuprinse între 4 și 20% în funcție de tipul de proteine care se doresc a fi separate. Aceste concentrații pot fi obținute prin folosirea unor proporții diferite de soluție de monomeri în soluția finală de polimerizare .

Peste soluția de polimerizare se adaugă tampon de electroforeză, apă distilată și doi agenți de polimerizare: persulfatul de amoniu și TEMED. Soluția astfel preparată se injectează între cele două plăci de sticlă, având grijă să nu se formeze bule de aer care ar influența negativ polimerizarea și migrarea. După turnarea gelului, în partea superioară a plăcilor de sticlă se introduce un piaptăn, de

grosime similara cu spațiatoarele, care poate să aibă un număr variabil de dinți. Pentru a se forma godeuri cu pereții complet polimerizați, piaptănul se șterge cu un tampon de vată înmuiat în TEMED.

După polimerizare, care durează de obicei două ore la temperatura camerei, clemele sunt desprinse și se scoate ușor piaptănul și spațiatoarele. Placile de sticlă împreună cu gelul polimerizat între ele se introduc în aparatul vertical de electroforeză.

Aparatul de electroforeză este prevăzut din două rezervoare, care prezintă doi electrozi de platină. După introducerea gelului în aparat și fixarea lui etanșă, în rezervoare se introduce soluția tampon care pot fi: Tris HCl, Tris Borat sau Tris Acetat (pH = 8,6). După aplicarea probelor în godeurile formate, aparatul se închide și se conectează la sursa de curent, migrarea făcându-se la voltaje cuprinse între 40 și 300 volți.

După migrare, gelul se scoate dintre cele două placi și se introduce într-o soluție de acid tricloracetic de concentrație 10%. Deși câmpul electric a fost întrerupt, proteinele au tendința de a migra din inerție și de aceea această soluție le precipită și fixează în locul în care au ajuns.

*În funcție de concentrația de acrilamidă și bisacrilamidă* întâlnită pe același gel, gelurile pot fi de trei feluri:

### **1. Geluri de o singură concentrație.**

Se folosesc în general când proba ce se dorește a fi separată conține molecule care au dimensiuni relativ asemănătoare, prepararea lor făcându-se așa cum a fost descris mai sus.

### **2. Geluri discontinue.**

Aceste geluri sunt foarte des folosite deoarece rezoluția lor este mult mai bună decât a precedentelor. Tehnica de lucru este asemănătoare dar necesită încă câțiva pași.

Diferența constă în faptul că gelul discontinuu este alcătuit din două zone: **gelul de separare (running gel)**, care se prepară asemănător cu precedentul, având o concentrație în funcție de mărimea moleculelor care urmează a fi separate. Acesta se toarnă între placi până când aproximativ 80 % din spațiu este plin. El este acoperit apoi, în partea unde ia contact cu aerul, cu o soluție de apă saturată în izopropanol. Acest lucru ajută la crearea unei suprafețe netede importantă în procesul de migrare, deoarece proteinele vor putea porni de la același punct de start, benzile separate fiind drepte. De menționat este faptul că pH-ul tamponului folosit pentru prepararea acestui gel este identic cu cel al tamponului folosit pentru încărcarea rezervoarelor aparatului, (pH = 8,6).

Între timp se prepară **gelul de reținere (stacking gel)**, care are o concentrație de 4%, pH-ul soluției tampon folosite pentru prepararea soluției gelului de reținere fiind de 6,8.

După polimerizarea completă a gelului de separare care durează aproximativ 2 ore, soluția de izopropanol se înlătură de la suprafața lui prin spălare cu apă distilată. În spațiul rămas se toarnă apoi gelul de reținere, se introduce piaptănușul și se mai așteaptă încă o jumătate pentru polimerizarea acestuia.

Dupa aplicarea probelor în godeurile formate, aparatul se închide și se conectează la sursa de curent, migrarea făcându-se la voltaje cuprinse între 40 și 300 volți.

Diferența de pH dintre cele două porțiuni din gel cauzează o discontinuitate a voltajului aplicat, având ca efect migrarea moleculelor împreună înspre gelul de separare. În momentul când acestea ajung la gelul de separare, ele sunt concentrate iar migrarea în acesta se face în funcție de mărime, formă și încărcătura electrică. Efectul acestui sistem discontinuu este obținerea unor benzi foarte bine individualizate.

### **3. Geluri gradient.**

Se folosesc cu succes pentru separarea proteinelor și fragmentelor de ADN de dimensiuni mici, a peptidelor și pentru separarea amestecurilor de proteine respectiv ADN cu greutatea moleculară diferite.

Concentrația de acrilamidă în aceste geluri este de 4% în partea superioară și crește liniar înspre partea inferioară putând ajunge la 20-25%. Benzile obținute în acest caz sunt foarte bine individualizate, datorită scăderii mărimii porilor pe măsură ce ne apropiem de partea inferioară a gelului, lucru care limitează difuzia moleculelor.

*În funcție de condițiile de migrare*, electroforeza în gel de poliacrilamidă se poate realiza în sistem **nativ** sau **denaturant**.

#### **1. Electroforeza în condiții native.**

Protocolul prezentat în continuare se poate folosi pentru migrarea proteinelor în condiții native. În acest caz ele migrează în câmpul electroforetic în funcție de încărcătura lor electrică, de formă și de mărime. Marele avantaj al acestui tip de migrare este că proteinele își păstrează structura lor naturală, activitatea enzimatică (în cazul enzimelor), lucru extrem de important în momentul în care se dorește realizarea diverselor studii cu privire la conformația lor, asocierile cu alte proteine și biomolecule, (fig. 8).

#### **2. Electroforeza în condiții denaturante.**

Constă în folosirea în gel și proba a agenților denaturanți: uree (Urea-PAGE) și β-mercaptoetanol. β-mercaptoetanolul este un agent reducător capabil să rupă legăturile disulfidice (în

cazul proteinelor) și să reducă polimerii la monomeri, ureea mentinând moleculele în stare denaturată. În acest caz proteinele își pierd proprietățile native.

Acest tip de electroforeză poate fi realizat și prin adăugarea de SDS, un detergent care se leagă de proteine și le neutralizează încărcătura electrică. În acest caz proteinele migrează în câmpul electroforetic în funcție de masa lor moleculară.

În cazul migrării ADN-ului în condiții denaturante, ca agent denaturant se folosește pe lângă uree și formamidă.

### Protocol de separare al variantelor genetice ale proteinelor din zer (gel nativ de poli-acrilamidă)

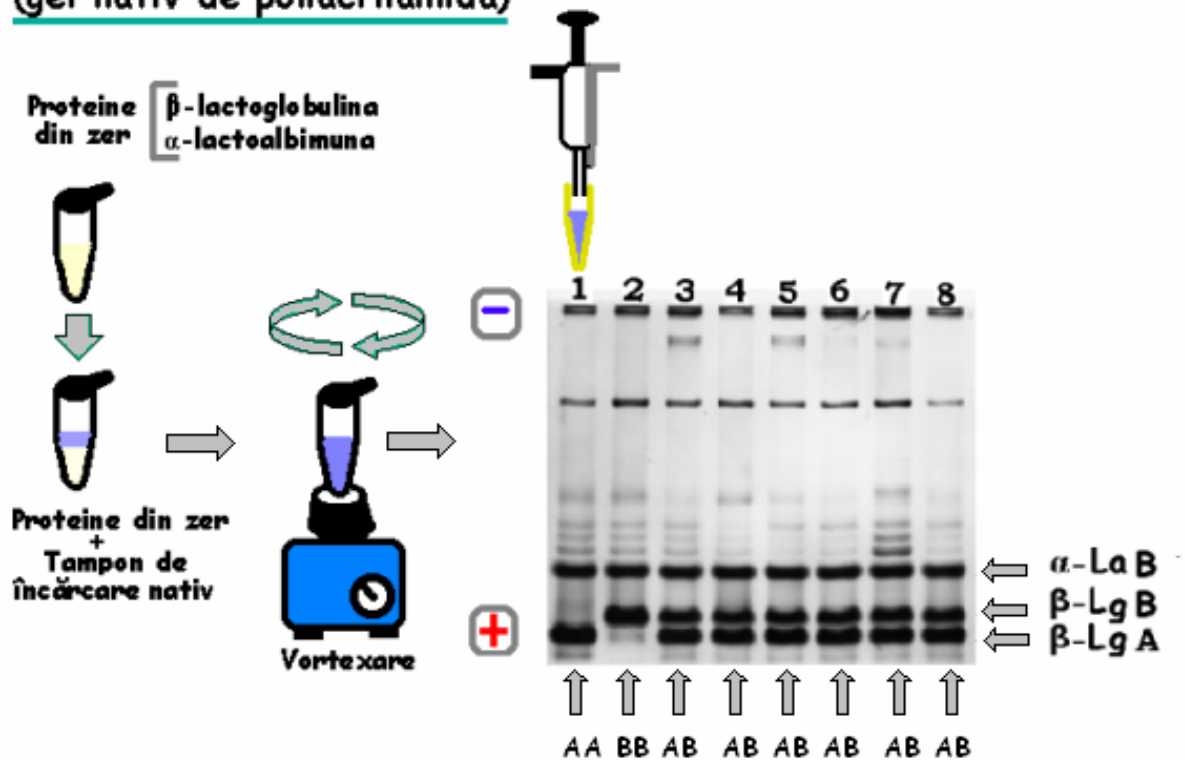


Fig. 8. Electroforeza proteinelor din zer de la taurine în gel nativ de poli-acrilamidă (sistem continuu, gel de o singură concentrație 14,2%). Aceasta metodă poate fi folosită pentru identificarea alelelor A și B ale  $\beta$ -lactoglobulinei (poza gel Lum, Medrano și colab. 1997).

### Protocol de separare al variantelor genetice ale cazeinelor (Urea-PAGE pH=9,5)

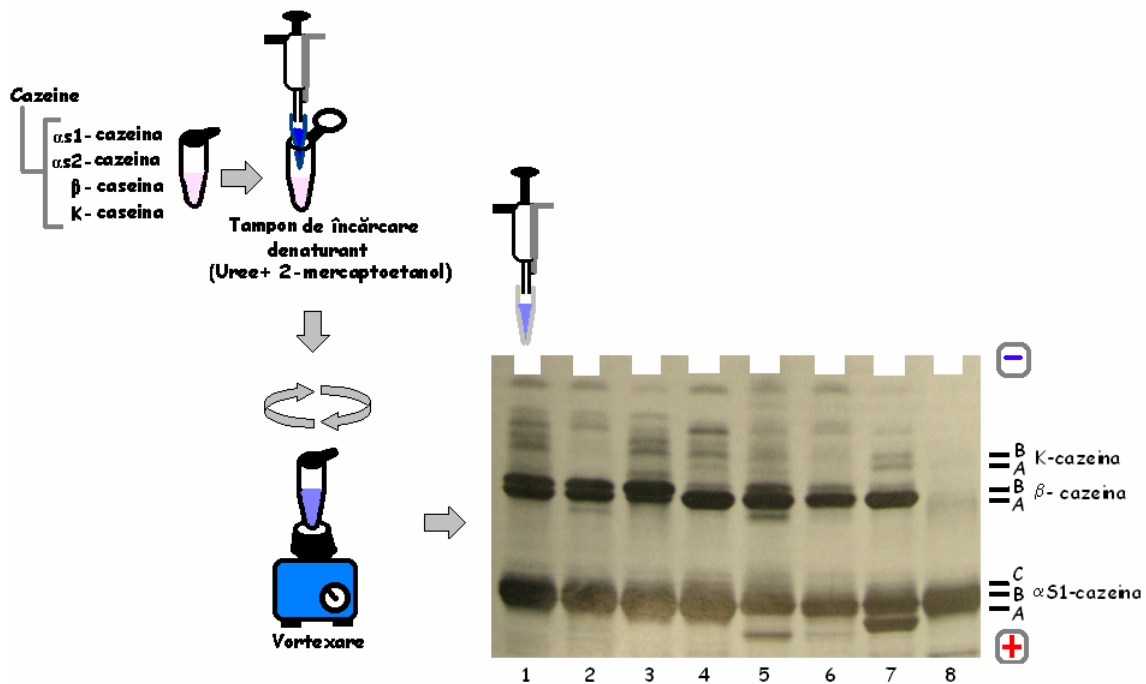


Fig. 9. Electroforeza fracțiunii cazeinice de la taurine în gel denaturant de poliacrilamidă, pH=9,5 (sistem discontinuu: 4,6% gel de retenție și 8% gel de migrare). Această metodă poate fi folosită pentru identificarea alelelor A și B ale K-caseinei, β-caseinei precum și alelelor A, B și C ale αS1-caseinei, (poza gel Medrano și colab. 1989). 1. K-caseina BB; β-caseina AB; αS1-caseina BC; 2. β-caseina AB; αS1-caseina BC; 3. K-caseina BB; β-caseina BB; αS1-caseina BC; 4. K-caseina AB; β-caseina AA; αS1-caseina BB; 5. K-caseina AB; β-caseina AA; αS1-caseina BB; 6. β-caseinei AA; αS1-caseina BB; 7. K-caseina AB; β-caseina AA; αS1-caseina AB; 8. αS1-caseina BC; standard Sigma.

### **Metoda Focalizării Izoelectrice**

IEF este o metodă electroforetică care separă proteinele în funcție de punctul izoelectric (pI). Proteinele sunt molecule amfoterice; ele pot să aibă încărcătură electrică pozitivă, negativă sau zero, în funcție de pH-ul din mediul în care se află (fig. 10).

Tehnica a fost folosită pentru prima dată pentru studierea polimorfismelor proteinelor din lapte la vacă în 1984 de către Seibert.

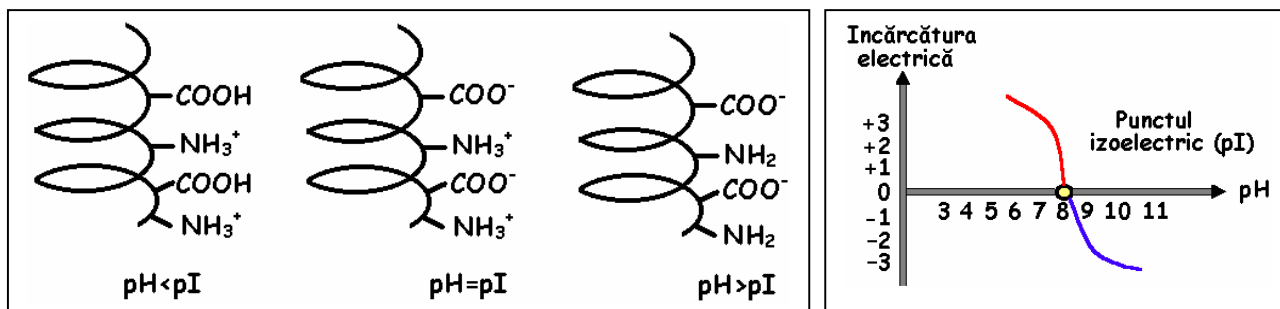


Fig. 10. Reprezentarea schematică a punctului izoelectric

Încărcătura electrică a unei proteine este dată de suma sarcinilor electrice pozitive și negative, care caracterizează aminoacizii componenți. Aceștia prezintă grupări amino și grupări carboxil terminale. În funcție de compoziția în aminoacizi a proteinei respective, încărcătura per total a proteinei poate să fie pozitivă sau negativă.

Punctul izoelectric este specific fiecărei specii proteice, încărcătura electrică a proteinei în acest punct fiind zero. Proteinele sunt încărcate pozitiv la valori ale pH-ului sub punctul lor izoelectric și încărcate negativ la valori ale pH-ului peste punctul lor izoelectric. Dacă încărcătura netă a proteinei este reprezentată grafic în funcție de pH-ul din mediul în care se află proteina (fig. 10), curba care rezultă va intersecta abscisa în punctul izoelectric.

Prezența unui gradient pH este foarte importantă pentru această tehnică. Într-un gradient pH, sub influența unui câmp electric o proteină se va mișca în gradient înspre locul unde încărcătura electrică a sa va fi zero. O proteină cu o încărcătură totală pozitivă va migra înspre catod (-), devenind din ce în ce mai puțin pozitivă pe măsură ce se apropie de punctul izoelectric. O proteină cu o încărcătură negativă va migra înspre anod (+), devenind mai puțin negativă pe măsură ce se apropie de punctul izoelectric. Dacă o proteină ar putea să difuzeze de la punctul său izoelectric, ea ar putea redobândi încărcătura sa electrică și ar migra înapoi. Acesta este efectul de focalizare folosit de această tehnică, care concentrează proteinele la punctele lor izoelectrice și permite apoi separarea lor pe baza unor diferențe mici de încărcătură electrică.

Rezoluția acestei tehnici depinde de panta gradientului de pH și de puterea câmpului electric. Tehnică folosește de obicei voltaje foarte mari (mai mari de 1.000 de volți). Când proteinele au atins punctul izoelectric în gradientul de pH, există o mișcare foarte redusă a ionilor în sistem, ceea ce duce la un curent final foarte mic (sub 1mA). Focalizarea izoelectrică pentru o anumită probă se face în general la un număr constant de volți - ore.

Migrarea se face în aparate de electroforeză orizontale. Ele folosesc ca și suport pentru migrarea probei de proteină geluri de poliacrilamidă de diferite dimensiuni. Gelurile pot fi preparate din soluțiile stoc de monomeri sau se pot cumpăra și gata preparate (fiind necesară doar un proces de rehidratare înainte de folosire), eliminând astfel riscul contaminării cu acrilamidă și bisacrilamidă (care sunt neurotoxice și cancerigene) și se asigură astfel un mare grad de reproductibilitate.

După aplicarea probelor voltajul este crescut apoi în mod gradual până la valoarea necesară pentru focalizare și este ținut aici câteva ore. Un voltaj inițial scăzut minimizează agregarea proteinelor din probă. Creșterea graduală a voltajului este recomandată pentru cantități mari de probă încărcată.

Vizualizarea proteinelor după migrare se face prin colorare cu Coomassie Brilliant Blue sau Silver Staining.

### ***Electroforeza în gel de agaroză***

Se utilizează în principal pentru separarea fragmentelor de ADN, care au fost supuse unui proces de amplificare. Se poate folosi și pentru separarea proteinelor.

Această metodă folosește ca și suport de separare agaroză, care se extrage din algele roșii ale genului *Rhodophyta*. Deplasarea fragmentelor de ADN se face sub influența câmpului electric, migrarea făcându-se în sistem orizontal. ADN-ul este încărcat negativ și ca urmare probele care vor fi supuse migrării, vor fi aplicate în gel în partea dinspre catod. Ele vor migra prin gelul de agaroză înspre anod, în funcție de mărimea lor. Gelurile de agaroză au o rezoluție mai slabă decât cele de poliacrilamidă, putându-se separa cu ajutorul lor, în funcție de concentrația de agaroză (1- 4%), fragmente cuprinse 100 pb – 60 kb.

Soluțiile tampon folosite pentru migrarea probelor de ADN dublu catenar, conțin EDTA la pH= 8 și Tris acetat (TAE), Tris borat (TBE) sau Tris fosfat (TPE). Aceste soluții tampon se prepară ca și soluții concentrate (10X) și se păstrează la temperatura camerei. TAE are o capacitate mai mică de tamponare decât celelalte două.

Prepararea gelurilor de agaroză pornește de la alegerea concentrației dorite, în funcție de mărimea fragmentelor ce urmează a fi supuse migrării. De exemplu, pentru o concentrație a gelului de 3%, se cântăresc 3 g agaroză, la care se adaugă până la 100 ml de TBE 1X. Această soluție se fierbe pe baie de apă, până la topirea completă a agarozei și formarea unei soluții omogene și limpezi. După o prealabilă răcire (nu completă), se toarnă în cuva de electroforeză iar apoi se introduce piaptănușul, care are un număr variabil de dinți în funcție de mărimea gelului. Se așteaptă 30

minute pentru polimerizare, după care se scoate piaptănușul iar gelul se introduce în aparatul de electroforeză. Peste el se toarnă apoi tamponul de migrare TBE 1X.

Probele de ADN, care au fost în prealabil mixate cu tampon de încărcare (conținând 500  $\mu$ l TBE 10X, 400  $\mu$ l glicerol și 100  $\mu$ l Bromfenol Blue 2%), în raport de 5:1, sunt apoi încărcate în godeuri. Adăugarea de bromfenol blue în tamponul de încărcare, ajută la urmărirea frontului de migrare. După închiderea aparatului de electroforeză se aplică un curent electric de 70 - 75 volți (voltaj constant), timpul de migrare fiind de aproximativ 3 ore la o concentrație a gelului de 3%.

Colorarea fragmentelor de ADN, se poate face cu ajutorul bromurii de etidiu. Aceasta poate fi inclusă în gelul de agaroză, înainte de turnare lui în cuvă. Ea va migra în sens opus ADN-ului, adică înspre catod și se va intercala printre moleculele acestuia. Dacă migrarea durează mult timp, bromura de etidiu va ieși din gel iar benzile sărace în ADN vor fi mai puțin vizibile. De menționat este faptul că bromura de etidiu introdusă în gel, scade cu aproximativ 15% mobilitatea fragmentelor de ADN. Colorarea se poate face și după migrare, aceasta având avantajul că aparatele de electroforeză nu se contaminatează. Dezavantajul major este faptul că fragmentele de ADN nu pot fi vizualizate în timpul migrării lor. Examinarea gelului se face în lumină UV, cu o lungime de 302 nm. Fotografierea gelului pentru examinări ulterioare se face în sistem polaroid sau cu ajutorul unei camere foto digitale.

### **Tehnici utilizate pentru identificarea polimorfismelor proteinelor din lapte la nivel de ADN**

#### **Tehnica PCR (Polymerase Chain Reaction).**

Se bazează pe polimorfismul la nivel alelic în ceea ce privește lungimea produsului de amplificare obținut cu ajutorul a 2 primeri specifici, complementari capetelor 3' ai secvenței de ADN ce urmează a fi amplificate. Producții de amplificare se separă prin electroforeză în gel de agaroză sau poliacrilamidă, iar după colorare cu bromură de etidiu se vizualizează în lumină ultravioletă, când apare o colorație fluorescentă în zona unde există fragmente de ADN migrate.

Polimorfismul poate fi foarte ridicat când primerii sunt complementari unor secvențe de ADN unice, care flanchează ADN-ul repetitiv. Când polimorfismul este scăzut, tehnica PCR poate fi completată cu *RFLP* (*Restriction Fragments Length Polymorphism*) numita și *CAPS* (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*), care presupune digestia enzimatică a produșilor de amplificare. Producții de amplificare și digestie se vizualizează în gelul de poliacrilamidă prin colorare argentică.



Markerii PCR sunt codominanți, existând posibilitatea diferențierii homozigoților de heterozigoți.

### **Tehnica de lucru**

**Amestecul de amplificare (PCR master mix)**, trebuie să conțină următoarele componente:

**1. PCR 10 X Buffer** - este o soluție tampon care menține pH-ul constant în timpul reacției de amplificare, fiind specific fiecărui tip de polimerază;

**2. Soluție de  $MgCl_2$  25mM** - are rolul de a media procesul de fixare al primerilor și activitatea enzimatică;

**3. Dezoxiribonucleotid trifosfați 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)** sunt utilizați de către polimerază în procesul de elongație;

**4. ADN polimerază 5 U/ $\mu$ l** - este o enzimă termostabilă la 95<sup>0</sup> C, fiind cea care realizează elongația. În funcție de bacteria de la care a fost extrasă poate să fie:

-**Taq polimerază** produsă de către bacteria termofilă *Thermus aquaticus*

-**Tth polimerază** produsă de către bacteria termofilă *Thermus thermophilus*;

**5. Primerii specifici**, se folosesc de obicei în concentrație de 10pmoli/ $\mu$ l;

**6. Amestecul** se completează cu **apă bidistilată** până la 24  $\mu$ l (pentru o reacție de 25 $\mu$ l);

**7. ADN-ul matriță** a cărei concentrație optimă poate să fie cuprinsă între 30 - 300ng/ $\mu$ l. Puritatea optimă este cuprinsă între 1,7-1,8. Purități mai mici nu afectează major amplificarea.

*Probele astfel pregătite se introduc în termocycler, aparat care poate fi programat să schimbe automat temperatura în diferite etape în funcție de profilul termic dorit.*

**Amplificarea propriu-zisă se realizează în trei etape**, etapa doi fiind compusă la rândul ei din trei subetape, care se repetă de 35 de ori. În urma acestor etape de amplificare fragmentul țintă este amplificat în milioane de copii.

**1. Predenaturarea ADN -ului**, constă în încălzirea amestecului de reacție la 95<sup>0</sup> C și menținerea acestei temperaturi timp de cel puțin 3 minute. În această etapă are loc ruperea punților de hidrogen dintre catenele complementare, rezultând ADN monocatenar;

**2. Denaturarea**, care se realizează la 94<sup>0</sup> C timp de 1 minut și are ca scop separarea completă a lanțurilor de ADN dublu catenar;

**3. Fixarea primerilor** se realizează de obicei la 45 – 60<sup>0</sup> C, în funcție de compoziția sa în baze azotate și dimensiunea lui. Acești primeri specifici pot să aibă dimensiuni de 20 – 30 pb, fiind complementari cu capetele 3' ale secvenței de ADN țintă;

**4. Extensia (Elongația)** are loc la temperatura de 72<sup>0</sup> C timp de 1 - 3 minute în funcție de lungimea produsului de amplificare dorit. Taq polimeraza funcționează la capacitate optimă la această temperatură. Elongația constă în alungirea secvenței de ADN țintă, de la locul de fixare al primerilor. Eficiența procesului de extensie este de 1 Kb/minut;

**5. Extensia finală**, care se realizează la 72<sup>0</sup> C timp de 7 minute și are ca scop finalizarea procesului de extensie;

**6. Stocarea probelor** care se face la 4<sup>0</sup> C pentru 24h, respectiv câteva luni la -20<sup>0</sup> C.

*Aceste probe vor fi supuse apoi migrării în gel de agaroză sau poliacrilamidă.*

### **Tehnica PCR –RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) sau CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)**

Cele două tehnici combinate au fost și sunt folosite cu succes pentru identificarea alelelor care au suferit modificări la nivelul situsurilor de restricție prin mutație sau restructurări la nivelul lor: deleția, duplicația, inversia, translocația unor fragmente. Tehnica RFLP se bazează deci pe polimorfismul la nivel alelic, în ceea ce privește dimensiunea și numărul fragmentelor de restricție obținute în urma digestiei cu enzime de restricție a produșilor de amplificare PCR.

Enzimele de restricție taie ADN-ul în situsuri specifice (situsuri de restricție), acolo unde întâlnesc repetiții inversate scurte de nucleotide, numite secvențe palindromice (tabelul 7).

Aceste enzime sunt produse de către bacterii, care se apără în acest fel de atacul bacteriofagilor. În momentul în care ADN-ul fagului pătrunde în interiorul bacteriei, acestea produc restricția. Ea nu se produce în momentul în care situsul de restricție este metilat (adăugarea unei grupări metil la adenina sau citozina din structura situsului de restricție). Fiecare tulpină bacteriană produce o enzimă de restricție specifică, care recunoaște o anumită secvență palindromică și taie numai în acel situs de restricție (tabelul 7).

Genele care codifică diferitele enzime de restricție, au fost clonate în E.coli, care produce astfel aceste enzime în mod curent și în cantități mari.

*Metoda PCR-RFLP necesită parcurgerea următoarelor **etape de lucru**.*

ADN-ul extras din proba de analizat este supus unui proces de amplificare PCR cu primeri specifici, care sunt complementari cu capetele 3' ale secvenței de ADN ce urmează a fi amplificate. Produsul de amplificare este supus apoi unui proces de digestie cu una sau mai multe enzime de restricție.

Tabelul 7

**Câteva enzime de restricție, situsurile lor de recunoaștere și bacteriile  
în care au fost descoperite**

| <i>Enzima</i> | <i>Bacteria sursă</i>  | <i>Situsul de restricție</i>                                                                                                      |
|---------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EcoR I        | Escherichia coli       | <div style="text-align: center;">▼</div> 5' G--A-A-T-T-C 3'<br>3' C-T-T-A-A--G 5'<br><div style="text-align: center;">▲</div>     |
| EcoR II       | Escherichia coli       | <div style="text-align: center;">▼</div> 5' G--C-C-T-G-G-C 3'<br>3' C-G-G-A-C-C--G 5'<br><div style="text-align: center;">▲</div> |
| Hinf I        | Haemophilus influenzae | <div style="text-align: center;">▼</div> 5' G--A-N-T-C 3'<br>3' C-T-N-A--G 5'<br><div style="text-align: center;">▲</div>         |
| Hind II       | Haemophilus influenzae | <div style="text-align: center;">▼</div> 5' G-T-Pi--Pu-A-C-3'<br>3' C-A-Pu--Pi-T-G 5'<br><div style="text-align: center;">▲</div> |
| Hind III      | Haemophilus influenzae | <div style="text-align: center;">▼</div> 5' A--A-G-C-T-T 3'<br>3' T-T-C-G-A--A 5'<br><div style="text-align: center;">▲</div>     |
| Hae III       | Haemophilus aegypticus | <div style="text-align: center;">▼</div> 5' G-G--C-C 3'<br>3' C-C--G-G 5'<br><div style="text-align: center;">▲</div>             |
| Mae II        | Methanococcus aeolicus | <div style="text-align: center;">▼</div> 5' A--C-G-T 3'<br>3' T-G-C--A 5'<br><div style="text-align: center;">▲</div>             |

Alegerea enzimei potrivite necesită cunoștințe despre secvența amplificată cu privire la numărul și poziția situsurilor de restricție specifice. Acest lucru este de maximă importanță atunci când se dorește discriminarea între două gene alele, dintre care una a suferit mutații la nivelul unui anumit situs de restricție. Cunoașterea acestui fapt se poate face printr-un proces de secvențiere, lucru important în stabilirea enzimei de restricție potrivite care urmează a fi folosită în procesul de genotipizare. Folosirea unor enzime inadecvate pentru respectivul fragment de ADN, poate să ducă la digerarea alelelor în mod identic, rezultând fragmente de dimensiuni asemănătoare (deci același

profil electroforetic) sau nedigerarea acestor fragmente amplificate, în cazul când pe ele nu există situsuri de restricție pentru enzima respectivă.

Procesul de digestie se realizează în general la 37°C timp de câteva ore sau se poate folosi și digerarea peste noapte, caz în care se va obține același profil electroforetic, neînregistrându-se procesul de supradigestie.

Fragmentele rezultate se separă în gel de agaroză, iar vizualizarea se face prin colorare cu bromură de etidiu în lumină ultravioletă .

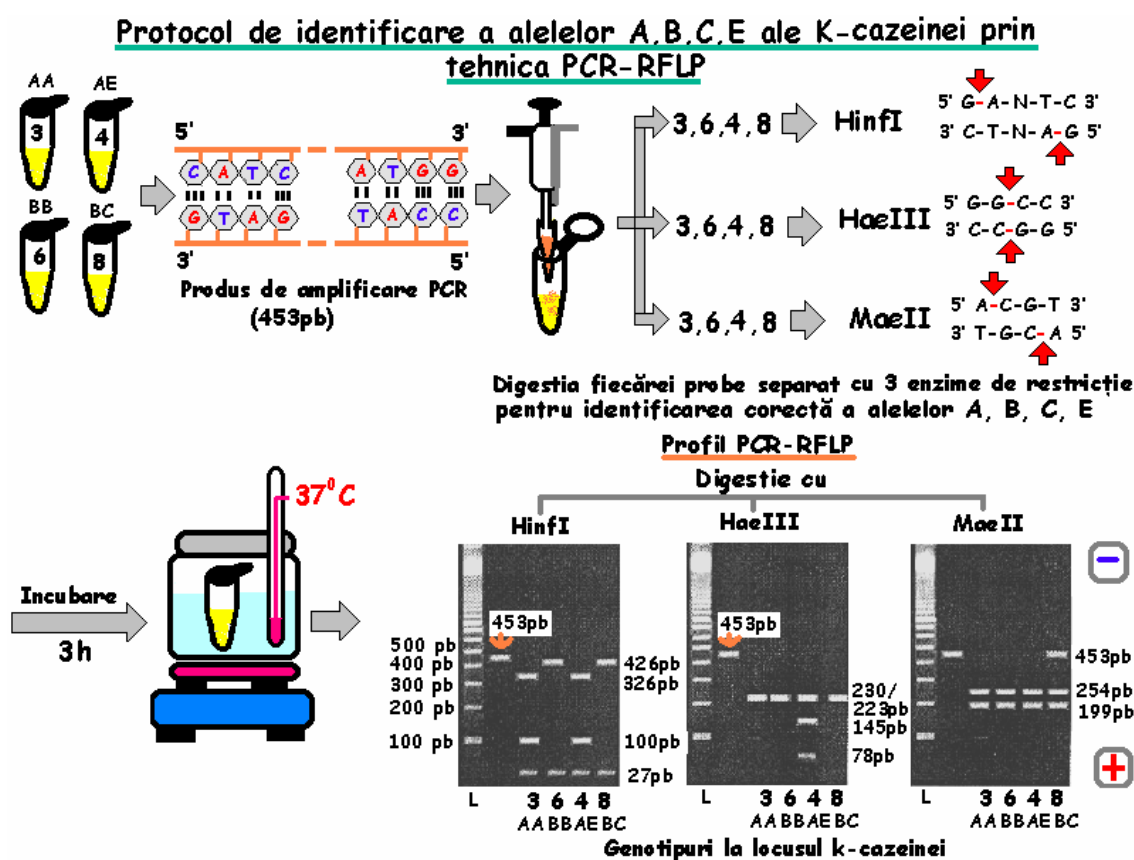


Fig. 11. Principiul tehnicii PCR-RFLP. Protocol de identificare a alelelor A, B, C și E ale K-cazeinei, prin digestia fiecărei probe separat cu 3 enzime de restricție.

### Utilizarea PCR – ului în zootehnie

De când a fost descoperită (Kary Mullis, 1985), tehnica PCR si variantele ei și-au găsit o largă aplicabilitate în domeniul ameliorării animalelor de ferma asistate de markeri genetici (MAS),

permițând determinarea genotipului la un anumit locus înainte ca un anumit caracter să se exprime fenotipic.

De exemplu în trecut determinarea genotipului indivizilor din F1 sau F2, care prezentau un fenotip dominant, se făcea prin retroîncrucișarea acestora cu părintele recesiv. Dacă raportul de segregare din R1 este de 50:50 %, înseamnă că individul la care am dorit să îi determinăm genotipul este heterozigot la locusul respectiv. Dacă în R1 se obțineau 100 % indivizi cu fenotip dominant, înseamnă că individul la care am dorit să îi determinăm genotipul este homozigot la locusul respectiv. Această metodologie de lucru deși a dat rezultate, timpul necesar determinării genotipului era foarte mare la animalele de fermă (câțiva ani).

*Tehnica PCR vine în sprijinul reducerii substanțiale a intervalului dintre generații și implicit a timpului necesar determinării unui anumit genotip. Metodologia de lucru este cea prezentată mai sus, necesitând doar cantități mici de ADN de la individul la care dorim să îi determinăm genotipul la un anumit locus și o aparatură destul de accesibilă. De obicei stabilirea genotipului la un anumit locus durează câteva ore.*

Marele avantaj al tehnicii este că permite determinarea genotipului unui anumit individ, la un anumit locus, indiferent de vârstă (embrion, făt, tineret, adulți), sex, stare fiziologică sau condiții de mediu.

Pe baza acestei tehnici s-a dezvoltat o nouă metodologie de lucru în ameliorarea animalelor de fermă, numită *MAS (Selecția asistată de markeri genetici)*, care vine în completarea schemelor clasice de ameliorare.

În ameliorarea clasică stabilirea cât mai corectă a valorii de ameliorare a unui individ implică cunoașterea a cât mai multe date privind performanțele proprii, ascendenților, colateralilor și descendenților ale aceluși individ. Toate aceste date sunt centralizate, metoda de stabilire a acestei valori de ameliorare, fiind cunoscută sub denumirea de BLUP.

*Selecția asistată de markeri (MAS) vine în sprijinul metodei BLUP, în scopul stabilirii și mai corecte a valorii de ameliorare.*

*Cercetările efectuate au scos în evidență o serie de markeri genetici, care sunt corelați cu producția cantitativă și calitativă de lapte. Astfel alelele K-cazeinei și alelele β-lactoglobulinei sunt principalii markeri genetici care se iau în calcul în stabilirea valorii de ameliorare. S-a determinat că genotipul BB la locusul K-cazeinei este corelat cu o cantitate mai mare de cazeină și lapte cu proprietăți superioare de prelucrare. Genotipul BB la locusul β-lactoglobulinei este corelat cu o cantitate mai mare de cazeină și grăsime iar genotipul AA cu o producție mai mare de lapte.*

*Genotipurile la cei 6 loci ce codifica proteinele majore din lapte pot fi determinate prin tehnicile prezentate în acest capitol.*

*Obiectivele și activitățile aferente anului 2008 au fost îndeplinite integral.*

**DIRECTOR PROIECT,  
Prof. dr. Creangă Șteofil**