

Caracterizarea fenotipică și genetică a rasei Sură de Stepă

Obiective:

- 1. Elaborarea documentației de specialitate și a tehnicilor de laborator specifice;*
- 2. Studii privitoare la însușirile cantitative și calitative ale laptelui, de la loturile studiate;*
- 3. Caracterizarea pentru genele lactoproteinelor (β -cazeina, k -cazeina, β -lactoglobulina) la exemplarele analizate;*
- 4. Alcătuirea loturilor de animale în funcție de genotipurile determinate;*
- 5. Determinarea grupelor sanguine și stabilirea individualității exemplarelor analizate;*
- 6. Realizarea cariotipului la exemplarele studiate.*

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:

- ✓ Documentație de specialitate, elaborarea modelului conceptual;
- ✓ Stabilirea machetelor de realizare a metodelor de lucru;
- ✓ Determinări cantitative ale laptelui la exemplarele studiate, *determinări statistice;*
- ✓ Determinări calitative ale laptelui la exemplarele studiate;
- ✓ Recoltarea și expedierea probelor de sânge și lapte, *stagiul de documentare a echipei de cercetare la un laborator de prestigiu în derminarea markerilor moleculari;*
- ✓ Determinarea genotipurilor pentru lactoproteinele bovine la rasa Sură de Stepă și stabilirea relațiilor respectivelor genotipuri cu însușirile morfoproductive și de rezistență ale rasei;
- ✓ Studiul genotipurilor rezultate și stabilirea dinamicii acestora în baza legilor specifice populațiilor panmictice;
- ✓ Publicarea de rezultate parțiale obținute;
- ✓ Elaborarea documentației de specialitate în vederea analizei grupelor sanguine;
- ✓ Analiza grupelor sanguine la exemplarele studiate;
- ✓ Elaborarea documentației de specialitate în vederea realizării cariotipului;
- ✓ Analiza cariotipului la exemplarele analizate.

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 (*figura 1*).

Asupra taurinelor Sură de Stepă nu se găsesc date mai recente privind caracterele productive 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

**STUDII PRIVITOARE LA ÎNSUȘIRILE CANTITATIVE ȘI CALITATIVE ALE
LAPTELUI, LA LOTURILE STUDIATE APARTINÂND RASEI SURĂ DE
STEPA DE LA S.C.D.B. DANCU IAȘI**

Vorbind despre calitatea laptelui, trebuie privit atât la însușirile fizico-chimice și organoleptice ale acestuia, cât și la o serie de indicatori precum: nivelul bacterian și biologic (numărul de bacterii și numărul de celule somatice); substanțe inhibitorii, cum ar fi impuritățile, dezinfectanții, antibioticele, etc.

Criteriile de calitate pentru laptele crud materie primă sunt stabilite în Cap. I din Secțiunea a IX-a, Anexa III a Regulamentului (CE) nr. 853/2004. Deoarece, restructurarea

unităților agro-alimentare a constituit una dintre problemele sensibile pentru aderarea României la U.E., Comisia Europeană a acordat o perioadă de tranziție, până la 31.12.2009 pentru unități de procesare a laptelui, în scopul alinierii acestora la cerințele de igienă comunitare.

Din punct de vedere calitativ, laptele de vacă trebuie să aibă conținutul în grăsime standard de 3,5 – 3,7%, proteină 3,2 %, densitatea minimă de 1,027, aciditatea 14-16°T, temperatura să nu depășească 4°C iar gradul de impurificare să se încadreze în limitele admise. Aciditatea liberă a laptelui se exprimă prin pH care arată concentrația în ioni de hidrogen din soluții. Laptele de vacă are pH- ul cuprins între 6,7-6,4. Punctul de congelare $-0,555^{\circ}\text{C}$ este caracteristica cea mai constantă a laptelui. Indicatorii care vizează nivelul bacterial și biologic al laptelui sunt prezentați în tabelul 1.

Tabelul 1

Calitatea laptelui în Uniunea Europeană cu referire la conținutul în celule somatice, număr total de germeni și spori butirici

<i>Specificare</i>	<i>Situația actuală</i>	<i>Obiective</i>
<i>NCS/ml</i>	< 400.000	< 250.000
<i>NTE/ml</i>	< 100.000	< 50.000
<i>Spori butirici/ml</i>	< 1.000	< 1.000

În tabelul 2 sunt prezentate valorile medii și ale variabilității 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 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.

Tabelul 2

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

Specificare	Statisticii probei	Lactație totală					Lactație normală				
		Lapte kg	% grăs.	Kg grăs.	% prot	Kg prot	Lapte Kg	% grăs.	Kg grăs.	% prot	Kg prot
Lactația I	n	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	\bar{X}	1589,64	4,64	68,94	3,53	49,95	1589,64	4,64	68,94	3,53	49,95
	$\pm s \bar{x}$	112,51	0,09	5,03	0,053	3,447	102,82	0,09	4,67	0,053	3,447
	s	595,35	0,49	26,62	0,242	15,794	544,10	0,49	24,74	0,242	15,794
	V%	36,69	11,24	39,18	6,86	31,60	36,43	11,21	37,48	6,86	31,60
	Min	360	3,40	15,00	3,07	27	360	3,40	15,00	3,07	27
	Max	2612	5,30	110,00	3,91	77	2612	5,30	107,00	3,91	77
Lactația II	n	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
	\bar{X}	1699,96	4,65	67,04	3,56	54,65	1699,96	4,65	67,04	3,56	54,65
	$\pm s \bar{x}$	147,15	0,09	5,09	0,053	3,915	147,15	0,09	5,09	0,053	3,915
	s	705,71	0,45	24,42	0,236	17,509	705,71	0,45	24,42	0,236	17,509
	V%	41,58	9,88	33,43	6,62	32	41,58	9,88	33,43	6,62	32
	Min	198	3,70	10,00	3,08	17	198	3,70	10,00	3,08	17
	Max	3565	5,40	111,00	3,90	99	3565	5,40	111,00	3,90	99
Lactația III	n	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	\bar{X}	2092,80	4,51	93,00	3,59	64,75	2092,80	4,51	93,00	3,59	64,75
	$\pm s \bar{x}$	215,08	0,12	8,76	0,053	3,915	215,08	0,12	8,76	0,053	3,915
	s	833,01	0,49	33,95	0,236	17,509	833,01	0,49	33,95	0,236	17,509
	V%	39,80	10,85	36,50	6,82	31,73	39,80	10,85	36,50	6,82	31,73
	Min	434	3,50	22,00	3,18	29	434	3,50	22,00	3,18	29
	Max	4080	5,30	144,00	3,90	99	4080	5,30	144,00	3,90	99
Lactația IV	n	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	\bar{X}	2082,10	4,62	91,10	3,65	70,51	2082,10	4,62	91,10	3,65	70,51
	$\pm s \bar{x}$	250,46	0,13	9,71	0,064	9,237	250,46	0,13	9,71	0,064	9,237
	s	792,03	0,41	30,72	0,222	31,998	792,03	0,41	30,72	0,222	31,998
	V%	38,04	8,94	33,72	6,09	45,40	38,04	8,94	33,72	6,09	45,40
	Min	835	4,10	45,00	3,21	30	835	4,10	45,00	3,21	30
	Max	3080	5,30	138,00	4,09	130	3080	5,30	138,00	4,09	130

Tabelul 2 (continuare)

Specificare	Statistici probei	Lactație totală					Lactație normală				
		Lapte kg	% grăs.	Kg grăs.	% prot	Kg prot	Lapte Kg	% grăs.	Kg grăs.	% prot	Kg prot
Lactația V	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	\bar{X}	2535,43	4,73	119,92	3,71	69,14	2535,43	4,73	119,92	3,71	69,14
	$\pm s \bar{x}$	448,22	0,21	25,25	0,038	6,753	448,22	0,21	25,25	0,038	6,753
	s	1185,89	0,57	66,82	0,10	16,541	1185,89	0,57	66,82	0,10	16,541
	V%	46,77	12,06	54,01	2,69	37,60	46,77	12,06	54,01	2,69	37,60
	Min	675	3,70	32,00	3,59	25	675	3,70	32,00	3,59	25
	Max	4087	5,30	212,00	3,88	95	4087	5,30	212,00	3,88	95
Lactația VI	n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	\bar{X}	1411,00	4,95	69,00	3,58	39	1411,00	4,95	69,00	3,58	39
	$\pm s \bar{x}$	201,67	0,15	9,28	0,103	7,348	201,67	0,15	9,28	0,103	7,348
	s	403,35	0,31	18,56	0,253	18	403,35	0,31	18,56	0,253	18
	V%	28,58	6,28	26,90	7,06	46,20	28,58	6,28	26,90	7,06	46,20
	Min	818	4,60	43,00	3,08	22	818	4,60	43,00	3,08	22
	Max	1705	5,30	87,00	3,79	65	1705	5,30	87,00	3,79	65
Lactația VII	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	\bar{X}	1519,00	4,66	83	3,54	68	1519,00	4,66	83	3,54	68
	$\pm s \bar{x}$	270,46	0,13	9,71	0,038	6,753	270,46	0,13	9,71	0,038	6,753
	s	792,03	0,41	30,72	0,10	14,541	792,03	0,41	30,72	0,10	14,541
	V%	18,04	3,94	13,72	2,29	27,20	18,04	3,94	13,72	2,29	27,20
	Min	835	4,10	45,00	3,49	66	835	4,10	45,00	3,49	66
	Max	1980	5,30	138,00	3,58	71	1980	5,30	138,00	3,58	71
Lactația VIII	n	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	\bar{X}	1078,5	5,28	57,44	3,71	39	1078,5	5,28	57,44	3,71	39
	$\pm s \bar{x}$	268,46	0,13	9,71	0,027	5,325	268,46	0,13	9,71	0,027	5,325
	s	792,03	0,41	30,72	0,15	12,72	792,03	0,41	30,72	0,15	12,72
	V%	12,04	2,94	10,72	2,14	15,10	12,04	2,94	10,72	2,14	15,10
	Min	875	5,19	45,00	3,69	39	875	5,19	45,00	3,69	39
	Max	1282	5,30	68,00	3,73	39	1282	5,30	68,00	3,73	39

Referitor la însușirile calitative ale laptelui, procentul de grăsime atinge valoarea maximă în lactația a V^a respectiv 4,71%. Aceeași evoluție se observă și la procentul de proteină care în lactația a V^a are valoarea de 3,71%. Variabilitatea la indicatorii menționați este intermediară spre mare (V = 6,09 – 12,06 %) ceea ce oferă un câmp larg ameliorării populației prin selecție, pentru indicatorii calitativi ai producției de lapte.

Cantitatea de grăsime și proteină au o evoluție asemănătoare cu a producției de lapte și asta datorită legăturii strânse care există între aceste caractere ($r_{pg} = 0,75 - 0,99$).

De menționat variabilitatea mare a indicatorii menționați, care evidențiază heterogenitatea populației studiate.

Variabilitatea indicatorilor calitativi ai producției de lapte este analizată în cadrul proiectului de cercetare, fiind prezentată succint în continuare (tabelul 3 și fig. 2).

În cazul procentului de proteină din lapte, modulul populației are frecvența relativă de 26,92 % și aparține clasei 3,54 – 3,66% proteină. Plus variantele sunt cuprinse în clasa modul și clasele mai mari decât modulul (3,67 – 3,78% respectiv 3,79 – 3,91% proteină).

Tabelul 3

Șirul de variație pentru procentul de proteină din lapte la lactația I-a

Clasa	Intervalul de clasa	Frecv. abs.	Frecv. rel.
1	3.03 – 3.16	4	15.38
2	3.17 – 3.28	2	7.69
3	3.29 – 3.41	3	11.54
4	3.42 – 3.53	2	7.69
5	3.54 – 3.66	7	26.92
6	3.67 – 3.78	6	23.08
7	3.79 – 3.91	2	7.69

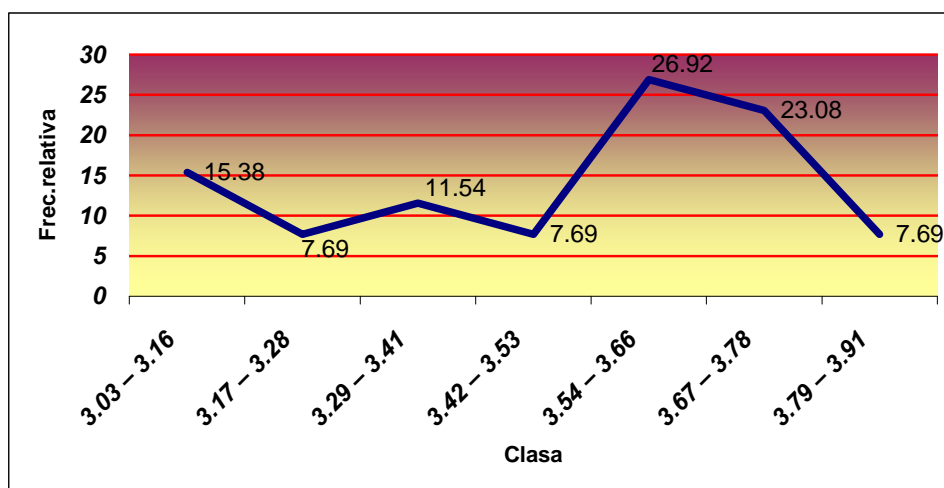


Fig. 2 Poligonul frecvențelor procentul de proteină din lapte la lactația I-a

CARACTERIZAREA PENTRU GENELE LACTOPROTEINELOR
(B-CAZEINA, K-CAZEINA, B-LACTOGLOBULINA),
LA EXEMPLARELE ANALIZATE

Studiul polimorfismului proteinelor din lapte la taurinele din rasa Sură de Stepă s-a realizat prin tehnica PCR-RFLP, iar pentru studiul polimorfismului tuturor lactoproteinelor bovine s-a utilizat și tehnica focalizării izoelectrice (IEF).

Utilizarea tehnicii PCR-RFLP.

Pentru extracția ADN^{ului} din leucocitele sangelui integral, a fost folosit kitul WizardGenomic DNA Purification Kit (Promega)

Pentru identificarea genotipurilor la cei doi loci studiați (k-cazeinei și β-lactoglobulinei), au fost folosite protocoalele descrise de Medrano și Aguilar-Cordova (1990). Ele permit identificarea alelelor A și B, care sunt cele mai frecvent întâlnite în cadrul populațiilor de taurine.

Amplificarea PCR:

Identificarea alelelor A și B de la locusul K-cazeinei se bazează pe amplificarea unui produs de 350 pb din genă cu ajutorul a doi primeri sens și antisens: JK 5: 5'-ATC ATT TAT GGC CAT TCC ACC AAA G-3'; JK3: 5'-GCC CAT TTC GCC TTC TCT GTA ACA GA-3'.

Diluarea primerilor a fost realizată cu apă distilată sterilă până la o concentrație de 10 picomoli/μl. Pentru un volum de reacție de 25μl au fost folosiți 24 μl de PCR master mix (cu compoziția optimă rezultată din diversele combinații încercate) și 1μl de ADN nediluat (cu concentrații între 105,9 - 556,9 ng/μl în funcție de probă).

Probele au fost amplificate într-un termocycler MyGene, folosind următoarele condiții:

- 1. Predenaturarea ADN^{ului}: 94°C/3 minute - 1 ciclu**
 - 2. Denaturarea: 94°C/1 minut**
 - 3. Fixarea primerilor: 60°C/1 minut**
 - 4. Extensia (Elongația): 72 °C/ 1 minut**
 - 5. Extensia finală: 72°C/7 minute- 1 ciclu**
- } 35 de cicluri**

Probele amplificate au fost stocate 24 ore la 4°C .

Pentru obținerea unui produs de amplificare de 262pb din gena β- lactoglobulinei în scopul identificării alelelor A și B, au fost folosiți doi primeri sens și antisens: BLGP3: 5'-GTC CTT GTG CTG GAC ACC GAC TAC A-3'; BLGP4 :5'- CAG GAC ACC GGC TCC CGG TAT ATG A-3'.

Diulara primerilor a fost realizată cu apă distilată sterilă până la o concentrație de 10 picomoli/μl. Volumul de reacție și ciclurile de amplificare au fost identice cu cele folosite în cazul K-cazeinei.

Digestia produșilor de amplificare:

Identificarea alelelor A și B ale K-cazeinei pe baza digestiei enzimatică a acestui *fragment de 350 pb (parte a exonului IV și intronului IV)*, a fost posibilă pe baza unor mutații care diferențiază cele două alele în această zonă. Astfel **în cazul alelei A** codonul ACC codifică treonina din poziția 136 a proteinei mature, iar codonul GAT codifică aminoacidul aspartat (acidul aspartic) din poziția 148. În cazul variantei B o citozină din codonul ACC este înlocuită cu o timină, transformându-se în ATC ce codifică izoleucina din poziția 136 din proteina matură. De asemenea, **la varianta B** înlocuirea adeninei cu citozina în codonul GAT, face ca codonul nou format CGT să codifice un alt aminoacid în poziția 148 și anume alanina. Ca urmare mutația GAT-GCT, face ca situsul de restricție al enzimei Hinf I din această poziție să dispară la varianta B. Pe baza acestei substituții, cele două alele pot fi diferențiate prin digestie cu Hinf I.

La un volum de 25 μl produs de amplificare din gena K-cazeinei, au fost adăugați 10μl de amestec de restricție conținând: 0,8μl Hinf I (8 unitati), 6,2μl apa deionizată sterilă, 3μl NEB 2 buffer.

Identificarea alelelor A și B ale β-lactoglobulinei s-a făcut pe aceleași principii. Variantele proteice A și B diferă prin două substituții de aminoacizi cauzate de două substituții de nucleotide din structura genei. **În cazul alelei A** în lanțul polipeptidic în poziția 64 se află aspartat (acidul aspartic), (codificat de codonul GAT) și valina în poziția 118 (codificată de codonul GTC). **În cazul alelei B** în lanțul polipeptidic, în poziția 64 acidul aspartic este înlocuit de glicină (codificată de codonul GGT), iar în poziția 118 în loc de valină întâlnim alanina (codificată de codonul GCC). Substituția timinei din codonul GTC de la alela A cu citozina (rezultând codonul GCC) la alele B, a creat un situs nou de restricție pentru enzima de restricție Hae III. Această substituție este plasată pe fragmentul de 262 pb amplificat (parte din exonul IV și intronul IV), făcând posibilă diferențierea celor două alele.

La un volum de 25 μl produs de amplificare din gena β-lactoglobulinei, au fost adăugați 12,5 μl de amestec de restricție conținând: 0,6 μl Hae III (6 unitati), 8,15 μl apă deionizată sterilă, 3,75 μl NEB 2 buffer.

Probele au fost incubate la 37° C pentru 3 ore în cazul K-cazeinei și peste noapte în cazul β-lactoglobulinei, pentru ca produșii de amplificare să fie digerați complet. Digestia a fost stopată prin

adăugarea a 7 μ l tampon de încărcare, conținând 500 μ l TBE 10X (TBE, pH=8,3), 400 μ l glicerol și 100 μ l Bromfenol Blue 2%.

Identificarea alelelor A și B ale K-cazeinei și β -lactoglobulinei prin migrarea în gel de agaroză:

Luând în considerare mărimea fragmentelor așteptate în urma digestiei (între 84-266 pb în cazul K-cazeinei, respectiv 74-153 pb în cazul β -lactoglobulinei), a fost preparat un gel de agaroză de concentrație 3%. Acest lucru a permis o bună separare a fragmentelor obținute în urma digestiei. Pentru prepararea a 100 ml de gel de concentrație 3%, au fost cântărite 3 g agaroză la care a fost adăugat TBE 1X până la 100 ml. După o scurtă omogenizare, soluția a fost transferată într-un pahar Erlenmayer și apoi încălzită pe o plită electrică cu agitator magnetic, până a devenit omogenă și limpede. După o prealabilă răcire (nu completă), au fost adăugați 8 μ l de bromură de etidiu (soluție de lucru), iar după o scurtă omogenizare gelul a fost turnat în cuva de electroforeză și lăsat la polimerizare 30 de minute.

Pobele restrictate au fost încărcate în godeuri, în primul godeu fiind introdus un ladder ADN de 123 pb iar în al doilea produsul de amplificare de 350 pb din gena K-cazeinei nedigerat. În cazul β -lactoglobulinei în al doilea godeu a fost introdus produsul de amplificare de 262pb nedigerat.

Electroforeza a fost realizată în tampon TBE 1X (pH= 8,3), la un voltaj de 70V timp de 2 ore. Examinarea gelului și preluarea imaginii s-a făcut în lumină UV.

Rezultate obținute:

Puritatea și concentrația ADN^{ului} a fost măsurată spectrofotometric. Puritatea a fost cuprinsă între 1,20-1,54, iar cantitatea de ADN extrasă din 200 μ l de sânge integral între 105,9-556,9 ng/ μ l. Probele de ADN nu au fost purificate, din fiecare probă folosindu-se la amplificare câte 1 μ l de ADN brut (nediluat).

Folosirea ADN^{ului} în afara purității considerată optimă (între 1,7-1,8) și a unei cantități mai mari decât cea specificată în literatura de specialitate (între 30-100 ng/ μ l), nu a afectat procesul de amplificare sau digestie. Acest lucru este dovedit de prezența în gel a unei mari cantități de produs de amplificare și de digestia lui complet realizată de enzimele Hinf I, respectiv Hae III.

Identificarea alelelor A și B ale K-cazeinei a fost posibilă prin amplificarea unui fragment de 350 pb, localizat între exonul IV și intronul IV, folosind primeri specifici (JK3, JK5). Acest fragment include 201 pb din exonul IV și 149 pb din intronul IV (*fig. 3*).

Fragmentul de ADN de 350 pb amplificat din alela A conține două situsuri de restricție pentru enzima Hinf I, unul în poziția 134 și altul în poziția 266, rezultând în urma digestiei cu

acesată enzimă trei tipuri fragmente de 132 pb, 134 pb, 84 pb. Ele corespund genotipului AA de la acest locus. Datorită unei mărimi aproape similare și prin urmare a imposibilității separării lor în gelul de agaroză, cele două fragmente de 132 pb respectiv 134 pb au migrat împreună și au apărut sub forma unei singure benzi, ce conține un amestec din aceste două fragmente (fig. 3).

Fragmentul de ADN de 350 pb amplificat din alela B conține doar un situs de restricție pentru enzima Hinf I în poziția 266, celălalt fiind abolit ca urmare a mutației. În acest fel în urma digestiei cu enzima Hinf I vor apărea două fragmente, unul de 266 pb și unul de 84 pb, corespunzătoare genotipului BB (fig. 3). În cazul genotipului heterozigot AB vor apărea în urma digestiei toate cele patru tipuri de fragmente vizualizate ca trei benzi de 266 pb, 132/134 pb respectiv 84pb (fig. 3).

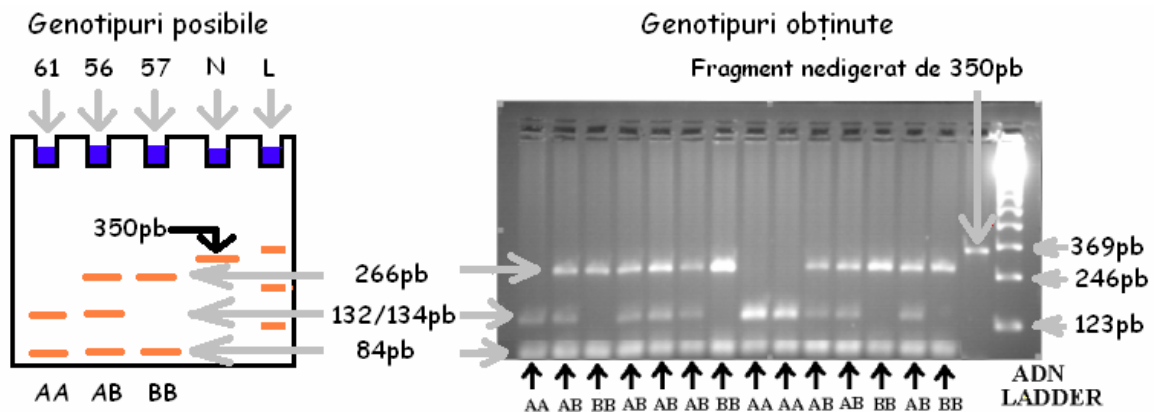


Fig. 3 Profil electroforetic evidențiind genotipurile obținute la locusul K-cazeinei prin amplificarea și digestia unui fragment de 350 pb din genă (parte a exonului IV și intronului IV), aparținând unor indivizi din rasa Sură de Stepă de la SCDCB Dancu, Iași

În populația analizată au fost identificate toate cele trei genotipuri de la locusul K-cazeinei, așteptate prin acest protocol (AA, AB, BB).

Identificarea alelelor A și B ale β -lactoglobulinei a fost posibilă prin amplificarea unui fragment de 262 pb, localizat între exonul IV și intronul IV, folosind primeri specifici (BGLP3, BGLP4).

Fragmentul de ADN de 262 pb amplificat din alela A conține un situs de restricție pentru enzima Hae III în poziția 109, rezultând în urma digestiei cu această enzimă două tipuri de fragmente, de 153 pb respectiv 109 pb. Ele corespund genotipului AA de la acest locus (fig. 4).

Fragmentul de ADN de 262 pb amplificat din alela B conține două situsuri de restricție pentru enzima Hae III, unul în poziția 109 și altul în poziția 188, apărut ca urmare a mutației (fig. 4). În acest fel în urma digestiei cu enzima Hae III vor apărea trei fragmente de 109 pb, 79 pb respectiv 74 pb, corespunzătoare genotipului BB. Datorită unei mărimi aproape similare și ca urmare a imposibilității separării lor în gelul de agaroză, cele două fragmente de 79 pb respectiv 74 pb vor migra împreună și vor apărea ca o singură bandă, ce va conține un amestec din aceste două fragmente (fig. 4).

În cazul genotipului heterozigot AB, vor apărea în urma digestiei toate cele patru tipuri de fragmente vizualizate ca trei benzi de 153 pb, 109 pb respectiv 74/79 pb (fig. 4).

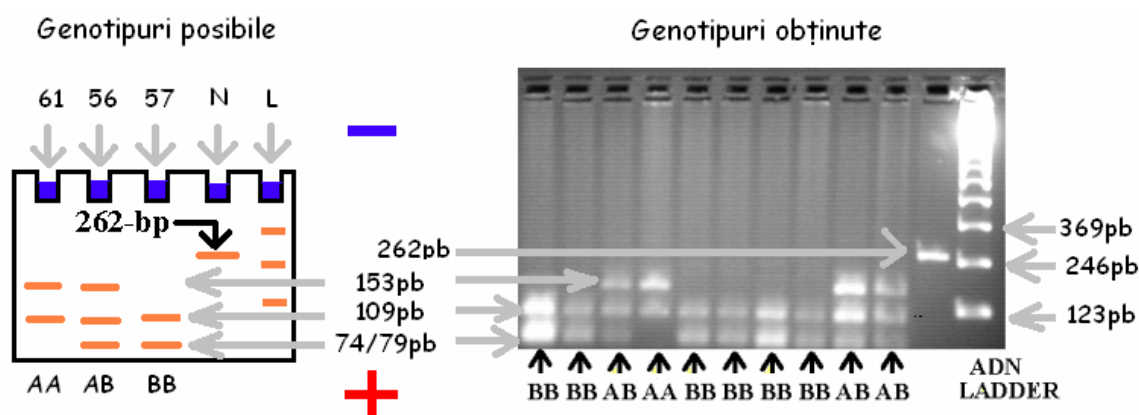


Fig. 4 Profil electroforetic evidențiind genotipurile obținute la locusul β -lactoglobulinei prin amplificarea și digestia unui fragment de 262 pb din genă (parte a exonului IV și intronului IV), aparținând unor indizi din rasa Sură de Stepă de la SCDCB Dancu, Iași

În populația analizată au fost identificate toate cele trei genotipuri de la locusul β -lactoglobulinei așteptate prin acest protocol (AA, AB, BB).

Studiul polimorfismelor proteinelor din lapte la taurinele din rasa Sura de Stepa prin tehnica focalizării izoelectrice (IEF).

Metode de lucru:

Probelor de lapte au fost recoltate individual de la 10 vaci aflate în lactație în tuburi Falcon de 15 ml, transportate la 4⁰ C și apoi congelate la -20⁰ C până la efectuarea analizelor.

Probele de lapte au fost decongelate lent la temperatura camerei si centrifugate la 8.000 rotații/minut timp de 5 minute pentru ecremare. Ele au fost apoi stocate 30 de minute la 4 grade pentru solidificarea grăsimii, care a fost apoi înlăturata în fiecare tub cu ajutorul spatulei.

Pentru o concentrație optimă de proteine, probele au fost diluate cu o soluție de uree si β -mercaptoetanol.

Probele au fost migrate într-un gel de poliacrilamidă de concentrație 4%. După migrare gelul a fost imersat într-o soluție 10% de acid tricloracetic.

Colorarea a fost realizată timp de 2 ore, cu ajutorul unei solutii de 0,025% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 40% etanol si 7% acid acetic glacial.

În *figura 5* pot fi vizualizate alelele identificate la cei șase loci, care codifica cele șase tipuri de proteine majore ale laptelui ($\alpha S1$ -cz; β -cz; K -cz; β -lg; α -la; $\alpha S2$ -cz).

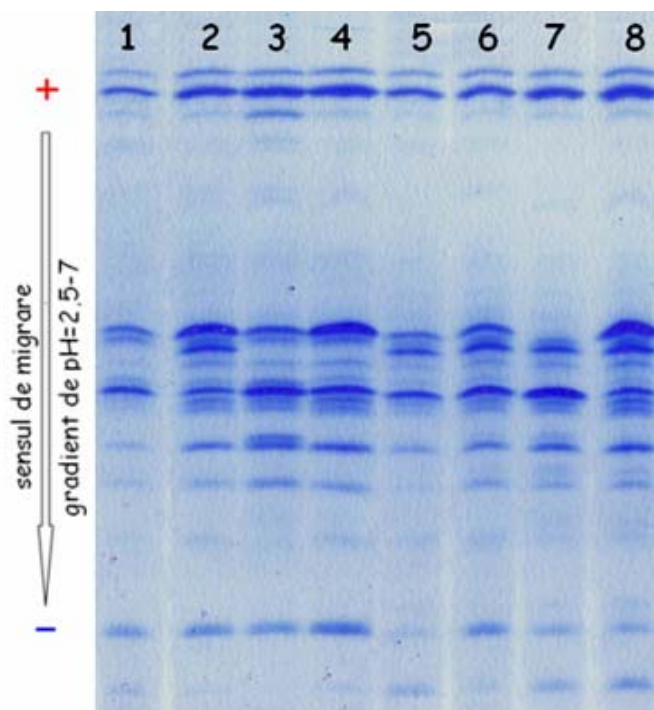


Fig. 5 Profil IEF aparținând unor indivizi din rasa sura de Stepa de la SCDCB Dancu, evidențiind allelele ale proteinelor majore din lapte

Structura genetică pentru sistemele polimorfe ale proteinelor din lapte: *alfa-cazeina* S_1 ($\alpha S1$ -cz), *beta-cazeina* (β -cz), *kappa-cazeina* (K -cz), *beta-lactoglobulina* (β -lg), *alfa-lactoglobulina* (α -la) și *alfa-cazeina* S_2 ($\alpha S2$ -cz) este prezentată în *tabelul 4*.

**Polimorfismul genetic al proteinelor din lapte la rasa Sură de stepă
de la S.C.D.C.B. Dancu Iași**

Nr. matricol	α S1-cz	β -cz	K-cz	β -lg	α -la	α S2-cz
9991	BI ^{RV}	A ₁ A ₂	AB	AB	BB	AA
9993	BB	A ₁ A ₁	BB	AB	BB	AA
9983	BB	A ₁ A ₂	AB	AB	BB	AA
9988	BB	A ₁ A ₂	BB	AA	BB	AA
0004	CI ^{RV}	A ₂ A ₂	AA	AB	BB	AA
9985	BC	A ₁ A ₂	AB	AB	BB	AA
9990	BB	A ₁ A ₂	BB	AA	BB	AA
9998	BC	A ₂ A ₂	AB	AB	BB	AA
9723	BB	A ₁ A ₁	BB	AB	BB	AA
9986	BC	A ₂ A ₂	AB	AB	BB	AA
Frecvența genotipurilor	BB = 0,5 BC = 0,3 CI ^{RV} = 0,1 BI ^{RV} = 0,1	A ₁ A ₁ = 0,2 A ₁ A ₂ = 0,5 A ₂ A ₂ = 0,3	AA = 0,209 AB = 0,416 BB = 0,375	AA = 0,292 AB = 0,500 BB = 0,208	BB = 1	AA = 1
Frecvența alelelor	p _B = 0,7 q _C = 0,2 r _{IRV} = 0,1	p _{A1} = 0,45 q _{A2} = 0,55	p _{A1} = 0,417 q _{A2} = 0,583	p _{A1} = 0,542 q _{A2} = 0,458	P _B = 1	p _A = 1

Cazeina α_{s1} – și în cazul nostru α_{s1} -Cn B este mai frecvent întâlnită, așa cum menționează literatura de specialitate, cu o frecvență mai mare de 0,7. La yak, o frecvență ridicată o are α_{s1} -Cn C, aceasta fiind mai mare de 0,6. Tot la yak o frecvență destul de mare (peste 0,3) o are o variantă destul de rară, α_{s1} -Cn E. Varianta α_{s1} -Cn A nu a fost găsită până în prezent decât la rasa Holstein (Aschaffenburg 1968; Gonyon și colab., 1987; Ng - Kwai - Hang și colab., 1984) și la rasa Roșie daneză (Thymann și Larsen, 1965). Varianta α_{s1} -Cn D, descoperită la rasa Flamandă (Grosclaude și colab., 1966), are o frecvență foarte redusă (cca. 0,01), mai fiind întâlnită la unele rase franceze și italiene.

Cazeina α_{s2} – este monomorfă la rasa Sură de stepă așa cum apare la toate rasele de bovine studiate până în prezent. Un polimorfism (varianta α_{s2} -Cn D), a fost pus în evidență de Grosclaude în

1987 la rasele Montbéliarde și Vosgienne. În 1981, Mahe a pus în evidență variantele α_{s2} -Cn B și α_{s2} -Cn C la Yak, cele două variante având frecvențe de 0,1 - 0,2.

Cazeina β – are cele două variante universale β -Cn A₁ și β -Cn A₂, răspândite la bovine și la zeb. Varianta β -Cn A₂, are o frecvență mai mare la majoritatea raselor studiate până în prezent. Varianta β -Cn A₁, are o frecvență mai ridicată la rasele originare din Europa de Nord - Vest, cum ar fi rasele Holstein, Ayrshire, Shorthorn (Kiddy, 1968; Li și Graunt, 1972; Grosclaude și Mahe, 1984), sau la rase înrudite cu acestea. *Varianta A₁ are o frecvență mare la rasele de taurine ameliorate.*

Frecvența mai ridicată a alelei A₂ are o semnificație deosebită, deoarece această alelă este cea ancestrală din care apoi au derivat filogenetic toate celelalte.

Varianta β -Cn A₃, are o frecvență foarte redusă, fiind descoperită la rasele din Europa de Nord - Vest, cum ar fi rasele Holstein, Ayrshire (Arave, 1967; Aschaffenburg, 1968; Li și Graunt, 1972), și la unele rase autohtone franceze din Normandia.

Varianta β -Cn B este de asemenea universal răspândită la rasele de bovine și la zeb, dar cu o frecvență mult mai redusă. Doar la rasa Jersey, frecvența ei este mai mare, apropiindu-se de 0,4 (Aschaffenburg, 1968, Kiddy și colab., 1968; McLean și colab., 1984).

Varianta β -Cn C, are o frecvență foarte scăzută, la majoritatea raselor europene și de pe celelalte continente (Grosclaude, 1974).

S-au mai descoperit o serie de variante foarte rare, în diverse țări cum ar fi: β -Cn E în Italia (Voglino, 1972), β -Cn B² în Noua Zeelandă (Creamer și Richardson, 1975), β -Cn A⁴ în Japonia (Abe și colab., 1975), β -Cn A³ mongolică, în Mongolia (Grosclaude și colab., 1982).

Cazeina kappa (K Cz). Toate cercetările au demonstrat indubitabil, influența favorabilă a variantei k-Cn B asupra calității laptelui, randamentului și calității brânzeturilor. De aceea în studiul lactoproteinelor bovine, cele mai multe cercetări s-au axat asupra determinării frecvenței alelelor kappa - cazeinei, la diverse rase, precum și posibilitatea promovării “limitate” prin selecție a variantei kappa cazeina B.

Variantele k-Cn A și k-Cn B sunt universal răspândite la bovine și zeb. S-au mai identificat în ultimul timp încă 3 variante: k-Cn C, k-Cn D și k-Cn E, toate având frecvențe mai mici de 0,1 și identificate doar la unele rase locale.

Varianta k-Cn A, are o frecvență medie mai ridicată, la majoritatea raselor. Astfel, la rasa Holstein, crescută în diverse țări, frecvența k-Cn A este cuprinsă între 0,6 - 0,85.

Varianta k-Cn B, are o frecvență mai mare la rasele din grupa Brună, de diverse proveniențe, cu valori cuprinse între 0,4 și 0,6. La rasa Jersey, frecvența k-Cn B este de asemenea mare (peste 0,6). Frecvența mai ridicată a k-Cn B, la aceste rase, este corelată pozitiv cu un procent ridicat de proteină din lapte și cu un randament mai ridicat în producția de brânzeturi.

Nepromovarea prin selecție a k-Cn B, în timp determină o reducere a frecvenței acesteia.

La metișii diverselor rase, frecvența k-Cn B este intermediară între frecvențele raselor pure, ceea ce relevă influența pregnantă a încrucișării, în transmiterea tipului dorit de kappa-cazeină.

α -lactalbumina. Variantele α -La A și α -La B, aparent există la majoritatea populațiilor de zeb (Aschaffenburg, 1968) dar la bovine se întâlnește doar varianta α -La B, aproape la toate rasele. Varianta α -La A, care este frecventă la zeb, este mai puțin rară în țările din Europa Centrală și Meridională, ea fiind descoperită la 11 rase italiene și la unele rase rusești și românești locale (după Mariani și Russo, 1977).

La banteg, s-a descoperit o variantă foarte rară, α -La C aceasta având frecvența absolută (1,0), la această specie (Bell și colab., 1981).

β -lactoglobulina. Două variante, β -Lg A și β -Lg B, sunt universal răspândite la bovine și zeb. Repartiția celor două variante la cele mai multe rase este destul de echilibrată.

Varianta β -Lg C, este proprie doar rasei Jersey (Bell, 1962; McLean și colab., 1984), iar β -Lg D, descoperită la rasa Montbéliarde (Graosclaude și colab., 1966), dar descoperită după aceea și la alte rase europene, pare a fi specifică doar la rasele cu aptitudini mai bune pentru carne. Ambele variante au frecvențe foarte reduse, sub 0,1.

Deși în filogenie varianta B este cea din care au derivat celelalte alelele cunoscute la acest locus, frecvența mai mare a alelei A demonstrează o oarecare muncă de ameliorare defășurată asupra rasei în vederea îmbunătățirii cantității laptelui.

DETERMINAREA GRUPELOR SANGUINE ȘI STABILIREA INDIVIDUALITĂȚII EXEMPLARELOR ANALIZATE

Grupele sanguine au fost determinate cu ajutorul testelor hemolitice.

Punerea în evidență a prezenței antigenilor are la bază reacția antigen-anticorp.

Studiul grupelor sanguine la animale a luat în ultimi 20 de ani un având deosebit datorita numeroaselor aplicații teoretice și mai ales practice în creșterea și ameliorarea animalelor. Elementul

de bază în aplicarea practică a grupelor sangvine la animale consta în faptul că grupele sangvine sunt ereditare și rămân constante tot timpul vieții animalului și ca orice individ nu poate avea în sângele său un antigen decât dacă el a moștenit gena respectivă de la unul din părinții săi.

În practica curentă, folosirea grupelor sangvine are aplicabilitate în câteva domenii cum ar fi: *stabilirea cu precizie a indentității animalului, stabilirea originii sau testul de paternitate, detectarea cazurilor de gemenii monozogotici, detectarea precoce a cazurilor de freemartinism, explicarea bolii hemolitice, stabilirea unei corelații între un anumit tip de grupă sangvină și anumite particularități morfo-fiziologice și productive.*

Din punct de vedere teoretic, grupele sangvine se folosesc pentru analiza filiației între rase și populații, stabilirea gradului de de homozigoție sau hetrozigoție într-o populație, precum și a studiilor de genetică ecologică. Toate acestea constituie domenii de cercetare care datorită grupelor sangvine, au dat un coeficient de certitudine maximal.

La taurine au fost cecetate 12 sisteme de grupe sanguine (A, B, C, F, J, L, M, S, Z, R'S', T', N').

În cercetările efectuate, cu ajutorul testelor hemolitice pentru cei 10 indivizi studiați aparținând rasei Sură de stepă, au fost evidențiate 8 sisteme sanguine: A, B, C, F, J, L, S, Z. De menționat că efectivul este heterogen și mic încât cel mai frecvent s-au întâlnit *antigenii H'* (în medie 93,0 %), *F* (87,0 %) și *W* (73,0 %) iar cu o frecvență mai mică *antigenii J₂'* (2,0%), *P₂* (4,0%), *B''* (6,0%), *D'* (8,0%), , *J₂*, *T₁*, *B'*, *P'*, *G'* (9,0 %).

Bucătaru N. (1996), în cercetările efectuate pe populații de Simmental metisate cu rasa Sură de stepă, menționează faptul că o dată cu creșterea cotei de participare a rasei Simmental se constată o tendință de creștere a frecvenței antigenilor *G₃*, *I₁*, *P₁*, *Q*, *T₁*, *J₂*, *B'*, *B''*, *G''*, *W*, *L'*, *F*, *J* și o scădere a frecvenței antigenilor *A₂*, *G₂*, *I*, *Q'*, *X₁*, *X₂*.

Cunoașterea particularităților imunogenetice ale raselor este absolut necesară și importantă în păstrarea genofondului acestora. În cadrul organizației F.A.O. se acordă o atenție deosebită ocrotirii și păstrării genofondurilor diverselor specii de animale. Prin urmare și în cazul rasei Sură de stepă trebuie evidențiate deosebirile care apar între rasa pură și metișii acesteia cu rasa Brună și Simmental.

REALIZAREA CARIOTIPULUI LA EXEMPLARELE STUDIATE

În ultimele decenii, atât pe plan mondial cât și în țara noastră un deziderat major al creșterii animalelor de fermă îl reprezintă realizarea și menținerea sănătății genetice a efectivelor. Identificarea purtătorilor de alterări ale materialului genetic și recomandarea măsurilor ce se impun pentru a împiedica diseminarea în populațiile de descendenți a acestor defecte ereditare constituie, obiectivul profilaxiei genetice care nu vizează tratamentul bolilor genetice, ci preîntâmpinarea lor. Necesitatea aplicării măsurilor de profilaxie genetică se impune la toate rasele de taurine crescute în țara noastră. Pornind de la aceste premize considerăm că studiul nostru va contribui, pe de o parte, la accentuarea ideii de pericol pe care îl reprezintă anomaliile cromozomale iar pe de altă parte, la conservarea unui efectiv de Sură de Stepă, sănătos genetic.

În etapa acestui an, s-a stabilit un lot de 10 vaci aparținând rasei Sură de Stepă care au fost investigate citogenetic.

După completarea datelor de origine au fost recoltate aseptice probele de sânge necesare pentru realizarea cariotipului.

Preparatele cromozomale s-au realizat prin tehnica de microcultură din sânge integral, cu unele modificări cerute de destinația preparatelor. Limfocitele sângelui periferic au fost cultivate pentru 72 de ore în mediu de cultură MEM Eagle cu săruri Earle și NaHCO_3 (Sigma) suplimentat cu 15 ser fetal de vițel (Sigma), soluție N-16 (IC) și fitohemaglutinină M(Difco), ca mitogen. Pe parcursul ultimelor 2 ore de cultură s-a adăugat bromură de etidiu ($10\mu\text{g/ml}$) pentru inhibarea contracției structurilor cromozomice. Cu 1 oră înainte de desfacerea culturilor s-a adăugat soluție de colchicină 0,004 pentru blocarea mitozelor în metafază, apoi s-a procedat la etapele următoare de prelucrare, conform protocolului convențional și anume hipotonizare în 0,075M KCl, fixări repetate în metanol/acid acetic glacial (3:1) și etalare pe lame reci. Colorarea s-a făcut cu Giemsa 10. Pentru fiecare individ s-au realizat câte două culturi. Preparatele mitotice au fost examinate la microscopul Nikon-Optiphot 2, în lumină directă. Calitatea acestora ne-a permis examinarea a câte 100 de metafaze pentru fiecare individ.

Întregul proces de analiză cromozomală, de la identificarea figurilor mitotice și până la evaluarea calitativă și cantitativă s-a realizat cu un echipament specific de analiză a imaginii. În condițiile experimentale actuale, dispunând de analiza computerizată a imaginii, preparatele cromozomale au fost analizate direct în câmpul microscopic iar cele mai bune figuri mitotice au fost achiziționate cu o cameră de luat vederi montată la microscopul Nikon și procesate în fișiere specifice de tip PCX.

Examenul citogenetic efectuat celor 10 de vaci de rasă Sură de Stepă a confirmat existența unui complement cromozomal normal, $2n=60, XX$.

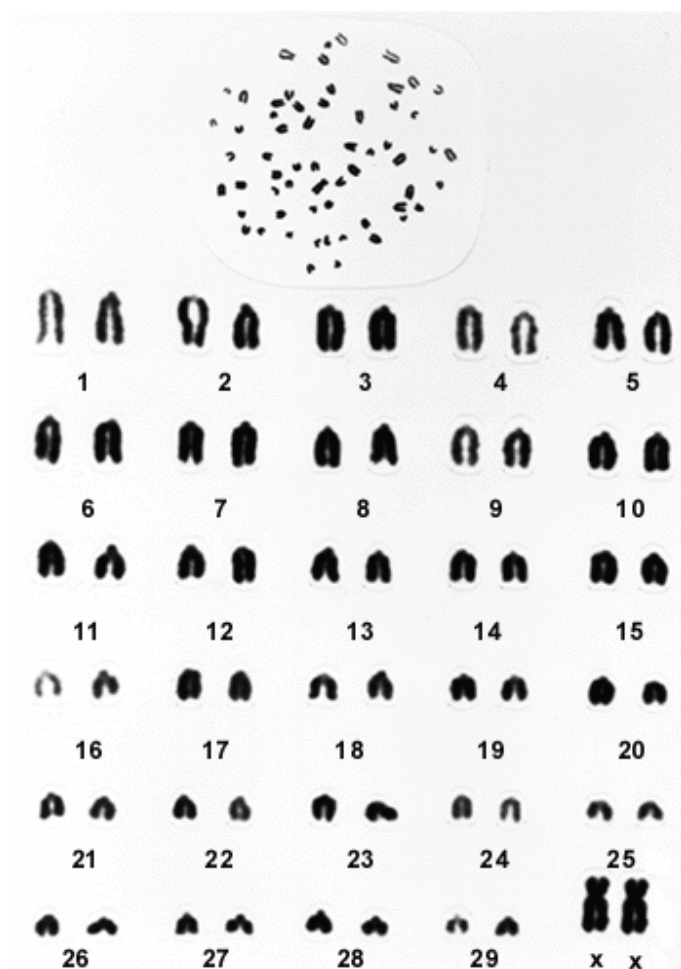


Fig. 6 Cariotip normal, 60,XX la femele de rasă Sură de Stepă

Obiectivele și activitățile aferente anului 2009 au fost îndeplinite integral.

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