

REZUMAT

Titlul tezei de doctorat: Cercetări privitoare la determinismul genetic al procesului de creștere la unele rase de ovine

Cuvinte cheie: *Ovis aries*; Miostatina; Single Nucleotide Polymorphisms; intron 1; 3'UTR; haplotipuri; diversitate genetică; caractere de creștere; caractere morfometrice; Cap Negru de Teleorman, Suffolk, Île de France, MAS.

Creșterea ovinelor reprezintă un sector important al zootehniei, contribuind semnificativ la obținerea unor producții valoroase, unele dintre ele având valoare biologică ridicată. În contextul creșterii cererii de carne de oaie, ameliorarea performanțelor de creștere a devenit o prioritate, iar utilizarea raselor specializate în încrucișări cu rasele autohtone, a condus la obținerea de indivizi cu dezvoltare corporală superioară. Totuși, absența unei selecții genetice sistematice a limitat progresul obținut, impunându-se astfel o abordare modernă bazată pe markeri moleculari.

Prezenta cercetare se concentrează pe gena miostatina (MSTN/GDF-8), un marker implicat în reglarea negativă a creșterii musculare. Mutațiile acesteia pot determina hiperplazie și hipertrofie musculară (McPherron & Lee, 1997), fapt ce implică variații semnificative ale caracterelor de creștere și dezvoltare musculară. Studiile anterioare (Clop et al., 2006; Gan et al., 2008; Johnson et al., 2009; Han, 2012; Hickford et al., 2010; Kolenda, 2016; Grochowska et al., 2019; Osman et al., 2021; Trapina et al., 2024; Zhao et al., 2024) au identificat numeroase polimorfisme de tip SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) în regiunile codificatoare (exonii), dar și în cele necodificatoare precum intron 1 și 3'UTR ale genei MSTN, cu implicații asupra mai multor caractere legate de creștere, dezvoltare corporală și musculară la ovine.

Materialul biologic utilizat în studiu a inclus indivizi din rasele de ovine Cap Negru de Teleorman, Suffolk și Île-de-France. Prima, o rasă autohtonă robustă ce se caracterizează prin dimensiuni corporale mari, rezistență și aptitudini bune pentru producția de carne, în timp ce Suffolk și Île-de-France sunt rase de import, amelioratoare, recunoscute pentru dezvoltarea musculară accentuată și randamentul superior la sacrificare. Selecția acestor rase a fost justificată de relevanța lor în ameliorarea producției de carne la ovinele din România și de răspândirea acestora în arealul de nord-est al țării, unde au fost desfășurate cercetările.

Obiectivul general al lucrării constă în identificarea și caracterizarea variațiilor genetice din regiunile intron 1 și 3'UTR ale genei MSTN, precum și evaluarea influenței acestora asupra caracterelor de creștere și dezvoltare corporală la cele trei rase.

Prima parte a tezei a fost elaborată pe baza consultării literaturii de specialitate și este structurată în trei capitole care abordează aspecte teoretice privind originea speciei *Ovis aries*, importanța sa economică și principalele rase de ovine crescute pentru producția de carne în România, cu accent pe cele incluse în studiu. Totodată, sunt analizate caracterele morfo-productive legate de dezvoltarea corporală, producția de carne și calitatea carcasei, precum și parametrii genetici asociați acestor caractere. Al treilea capitol este dedicat rolului markerilor genetici în selecția și ameliorarea producției

de carne la ovine, cu prezentarea celor mai relevante gene candidate implicate în procesul de creștere și dezvoltare musculară, accentul fiind pus pe caracterizarea genei miostatina (MSTN), descrisă detaliat din perspectiva rolului său de marker genetic, a mutațiilor identificate în secvența acesteia și a impactului acestora asupra caracterelor de creștere și conformației corporale, conform studiilor raportate de numeroși autori la alte rase de ovine.

A doua parte a tezei integrează cercetările experimentale realizate și completează informațiile existente în literatura de specialitate privind diversitatea genetică a raselor de ovine și relația dintre variațiile nucleotidice și caracterele de producție. Această secțiune cuprinde patru capitole, structurate astfel: metodologia utilizată în desfășurarea cercetării, rezultatele privind caracterizarea fenotipică și genetică a populațiilor analizate, identificarea polimorfismelor din regiunile intron 1 și 3'UTR ale genei MSTN, precum și asocierea haplotipurilor și mutațiilor identificate cu caracterele de producție.

Scopul prezentei cercetări este investigarea determinismului genetic al caracterelor de creștere și dezvoltare corporală la ovine din rasele Cap Negru de Teleorman, Suffolk și Île-de-France, prin identificarea și analiza polimorfismelor de tip SNP în două regiuni specifice ale genei MSTN (GDF-8) - intron 1 și 3'UTR. Alegerea acestor regiuni este justificată prin numeroase studii care le descriu ca zone hipervariabile cu rol în modularea expresiei genei MSTN, în special intronul 1, unde s-au raportat frecvent polimorfisme cu efect asupra creșterii musculare (Clop et al., 2006; Gan et al., 2008; Johnson et al., 2009; Han, 2012; Hickford et al., 2010; Kolenda, 2016; Grochowska et al., 2019; Osman et al., 2021; Trapina et al., 2024; Zhao et al., 2024). În plus, mutația c.1232G>A din regiunea 3'UTR a fost asociată constant cu dezvoltarea musculară superioară la ovine, fiind considerată un marker genetic valoros în selecția pentru producția de carne.

Cercetările au fost orientate pe două direcții principale:

a) Evaluarea fenotipică a caracterelor de creștere (greutatea la naștere, greutatea la înțârcare, sporul mediu zilnic) și a principalelor caractere morfometrice (greutatea corporală, înălțimea la grebăn, înălțimea la crupă, lungimea trunchiului, lărgimea pieptului, lărgimea crupei, perimetrul toracic și perimetrul fluierului);

b) Analiza moleculară a variabilității în regiunile intron 1 și 3'UTR ale genei MSTN, prin identificarea SNP-urilor și evaluarea asocierii acestora cu caracterele fenotipice analizate.

Pe baza acestor direcții s-au formulat următoarele obiective specifice:

- ✓ Caracterizarea fenotipică a indivizilor pe baza măsurătorilor corporale și a datelor de creștere;
- ✓ Colectarea și procesarea probelor biologice pentru izolarea și evaluarea calității ADN-ului;
- ✓ Amplificarea fragmentelor țintă din regiunile intron 1 și 3'UTR și secvențierea acestora prin metoda Sanger;

- ✓ Identificarea și descrierea polimorfismelor nucleotidice (SNP) prin alinierea secvențelor obținute cu cele de referință din baza de date NCBI;
- ✓ Evidențierea mutațiilor cu potențial de marker genetic și evaluarea importanței lor în ameliorarea raselor studiate;
- ✓ Analiza statistică a influenței haplotipurilor și a SNP-urilor identificate asupra caracterelor de creștere și dezvoltare corporală.

Atingerea obiectivelor propuse în cadrul acestei teze a fost posibilă prin desfășurarea etapelor experimentale în teren și în laboratoare specializate din țară și străinătate. Activitățile din teren au fost realizate în fermele de proveniență ale efectivelor de ovine, unde s-au efectuat prelevările de sânge și măsurătorile corporale necesare evaluării caracterelor de creștere și dezvoltare corporală ale indivizilor incluși în studiu. Etapele de documentare, fundamentare teoretică, elaborare a metodologiei și sistematizare a datelor s-au desfășurat la Facultatea de Ingineria Resurselor Animale și Alimentare din cadrul Universității de Științe ale Vieții „Ion Ionescu de la Brad” din Iași.

Analizele moleculare au fost efectuate în Laboratorul de Genetică Moleculară al Facultății de Biologie din cadrul Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, unde s-au realizat izolarea și purificarea ADN-ului din sânge, amplificarea fragmentelor țintă prin reacția de polimerizare în lanț (PCR), precum și pregătirea probelor pentru secvențiere. În total, au fost prelevate 35 de probe de sânge, dintre care 34 au fost validate pentru analizele genetice.

Secvențierea ADN pentru regiunile intron 1 și 3'UTR ale genei MSTN a fost realizată în colaborare cu laboratorul internațional MacroGen-Europe (Amsterdam, Olanda), specializat în tehnologii de secvențiere de ultimă generație. Metoda utilizată este secvențierea de tip Sanger (Chain Termination). Rezultatele au fost transmise în format electronic, sub formă de fișiere FASTA și cromatograme, corespunzătoare fiecărei probe analizate.

Pentru analiza variabilității moleculare a genei MSTN (GDF-8), secvențele obținute au fost comparate cu cele de referință din NCBI-GenBank (*Ovis aries* ARS-UI_Ramb_v3.0, Accession GCF_016772045.2; cromozom 2, Accession NC_056055.1). Secvențele brute, exportate în format FASTA, au fost corectate, aliniate și analizate în MEGA 11 (Tamura et al., 2021), utilizând algoritmul ClustalW (Thompson et al., 1994). Pe baza acestor aliniamente s-au identificat SNP-urile, grupate ulterior în haplotipuri distincte folosite în analizele comparative.

Diversitatea genetică, frecvențele haplotipurilor, distanțele genetice și dezechilibrul de legătură (LD) au fost calculate în DnaSP v.6 (Rozas et al., 2017), iar rețelele de haplotipuri reconstruite în Network 10 (Fluxus Technology Ltd.). Pentru evidențierea relațiilor filogenetice, au fost integrate în analiză secvențe ale regiunilor analizate MSTN pentru alte rase de ovine descărcate din GenBank, arborii fiind construiți în MEGA 11 prin metoda Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987).

Analiza statistică a datelor fenotipice și genetice s-a realizat în IBM SPSS Statistics (v.26) și completată cu Real Statistics Resource Pack (Zaiontz, 2013-2024). Principalii estimatori (media aritmetică, abaterea standard, coeficientul de variație) au

fost calculați conform metodologiei clasice (Ivancia, 2007; Dronca & Ivancia, 2023). Efectele haplotipurilor, sexului și rasei asupra caracterelor de creștere și dezvoltare corporală au fost evaluate prin model liniar general (GLM) cu trei factori:

$$y_{ijk} = \mu + H_i + S_j + R_k + \varepsilon_{ijk}, \text{ unde:}$$

- y_{ijk} = caracterul studiat
- μ = media generală
- H_i = efectul haplotipului (H_1, H_2, H_3)
- S_j = efectul sexului (femelă, mascul)
- R_k = efectul rasei (Cap Negru de Teleorman, Île de France, Suffolk)
- ε_{ijk} = eroarea reziduală

Diferențele semnificative între grupuri au fost testate prin Tukey HSD, la un prag de semnificație de $P < 0,05$.

Analiza fenotipică

Rezultatele privind caracterele de creștere au arătat, în toate cele trei rase (Cap Negru de Teleorman, Île-de-France, Suffolk), valori superioare la masculi pentru toate trăsăturile analizate. Greutatea la naștere a variat între 3,5-5,8 kg, greutatea la înțărare între 24-52 kg, iar greutatea la bonitare între 51-78 kg. Sporul mediu zilnic a fost mai ridicat în primele 90 de zile, cu valori cuprinse între 230-520 g/zi. Coeficienții de variație au fost, în general, sub 15%, indicând faptul că efectivele au fost omogene.

Măsurătorile corporale evidențiază un dimorfism sexual pronunțat, masculii având greutate corporală între 80-115 kg, iar femelele între 70-85 kg, cu diferențe mari pentru înălțimea la grebăn (63-79 cm) și perimetrul toracic (100-120 cm).

Comparația între rase, arată diferențe clare în nivelul performanțelor de creștere și dezvoltare corporală: Indivizii din rasa Suffolk prezentând cele mai mari valori pentru greutate și sporuri medii zilnice; Île-de-France a înregistrat valori intermediare, dar cu o variabilitate mai redusă; în timp ce Cap Negru de Teleorman a avut valori mai mici pentru caracterele de creștere, dar proporții corporale echilibrate, specifice tipului său morfologic.

Analiza secvențelor genice

Analizele genetice efectuate pentru cele 34 de probe provenite din rasele Cap Negru de Teleorman, Île-de-France și Suffolk au vizat secvențele din regiunile intron 1 și 3'UTR ale genei MSTN (GDF-8), cu scopul de a identifica variații nucleotidice față de secvența de referință *Ovis aries* (GenBank: NC_056055.1). Cuantificarea spectrofotometrică a ADN-ului, realizată cu Nanodrop ASP-3700, a evidențiat concentrații cuprinse între 10,4 și 86,7 ng/μl (media 34,7 ng/μl) și rapoarte A260/A280 între 1,7 și 2,0, confirmând puritatea adecvată pentru amplificare și secvențiere.

Identificarea SNP-urilor și construirea rețelei de haplotipuri

Analiza regiunilor intron 1 și 3'UTR ale genei MSTN a evidențiat existența unor SNP-uri cu distribuție diferită între rasele Cap Negru de Teleorman, Île-de-France și Suffolk. În regiunea intron 1 au fost identificate zece substituții nucleotidice, dintre care trei (g.824G>A, g.827T>C și g.840G>T) au prezentat frecvențe ridicate și distribuție

comună tuturor raselor. Polimorfismul g.840G>T a fost cel mai frecvent, prezent la 71,4% dintre indivizii Cap Negru de Teleorman, 40% la Île-de-France și 100% la Suffolk. Variantele g.824G>A și g.827T>C au avut o distribuție similară, dar cu ponderi mai mari în Cap Negru de Teleorman, unde mulți indivizi au prezentat toate cele trei substituții concomitent, conturând un haplotip specific acestei populații. În schimb, la Suffolk s-au identificat și mutații rare (g.607A>T, g.672A>G, g.822T>C etc.), fapt care sugerează o diversitate genetică mai mare în interiorul acestei rase.

Comparativ cu literatura de specialitate, opt dintre polimorfismele identificate coincid cu cele raportate anterior la alte rase de ovine (Clop et al., 2006; Hickford et al., 2010; Kolenda et al., 2016; Han et al., 2013).

În regiunea 3'UTR au fost identificate opt variații, majoritatea localizate la indivizi din rasa Cap Negru de Teleorman, unde doi indivizi au avut șase mutații (g.6363T>A, g.6405T>C, g.6414T>G, g.6432T>G, g.6468C>G, g.6438T>G, g.6507A>G.). La Île-de-France a fost detectată o singură substituție (g.6412A>C), iar la Suffolk nu s-a observat nicio variație, ceea ce confirmă conservarea ridicată a acestei regiuni. În plus, polimorfismul c.*1232G>A, frecvent raportat în alte populații ovine, nu a fost identificat în niciuna dintre secvențele analizate.

Analiza diversității genetice pe baza numărului mediu de substituții per situs (model Maximum Composite Likelihood, MEGA11) a indicat o variabilitate redusă, dar neuniform distribuită între rase. În interiorul raselor, distanțele medii au fost de 0,0046 la Cap Negru de Teleorman, 0,0050 la Île de France și 0,0062 la Suffolk, ceea ce arată cea mai mare heterogenitate genetică internă la Suffolk și cea mai mică la Cap Negru de Teleorman. Între rase, distanțele au variat între 0,00491 și 0,00639 substituții/situs, cu cea mai mică diferență între Cap Negru de Teleorman și Île de France (0,00491) și cea mai mare între Île de France și Suffolk (0,00639).

Pe baza secvențelor din intronul 1 au fost identificate 10 haplotipuri (H_1–H_10), cu o diversitate haplotipică $H_d = 0,7701$, ceea ce indică un nivel moderat–ridicat de variabilitate în această regiune. H_1 este haplotipul cel mai frecvent (13 indivizi din toate cele trei rase), fiind predominant în Cap Negru de Teleorman (57,1%) și prezent la Suffolk (40%) și Île de France (10%). H_2 (10 indivizi) apare doar la Cap Negru de Teleorman și Île de France și corespunde secvenței de referință NCBI, putând fi considerat haplotip ancestral. H_3 (4 indivizi) este întâlnit mai ales la Île de France, iar celelalte haplotipuri (H_4–H_10) sunt rare, fiecare reprezentat de un singur individ; aceste haplotipuri unice sunt mult mai frecvente la Suffolk, unde 60% din indivizi prezintă variante proprii.

Analiza regiunii 3'UTR a genei MSTN a confirmat un nivel ridicat de conservare genetică în toate cele trei rase analizate, cu o variabilitate aproape nulă. Diversitatea nucleotidică a avut valori foarte scăzute: 0 la Suffolk, 0.0009 la Île de France și 0.0055 la Cap Negru de Teleorman, unde au fost identificate câteva haplotipuri rare. Distanțele genetice dintre rase au variat între 0.00044 și 0.00329 substituții per situs, cea mai mică fiind între Île de France și Suffolk, iar cea mai mare între Cap Negru de Teleorman și Île de France.

Structura haplotipurilor în 3'UTR este simplă și dezechilibrată, cu patru haplotipuri identificate ($H_d \approx 0.17$). H_1 domină populația (91,2% din totalul indivizilor), fiind prezent la toate exemplarele Suffolk, la 90% dintre indivizii Île de France și la 85,7% din Cap Negru de Teleorman. Haplotipurile H_2, H_3 și H_4 sunt rare, fiecare întâlnită la câte un singur individ.

Rețeaua haplotipurilor evidențiază H_1 ca haplotip central, din care derivă celelalte prin substituții unice, iar valorile foarte mici ale dezechilibrului de linkage ($D \approx 0-0,06$) confirmă absența blocurilor haplotipice stabile și segregarea independentă a variantelor rare. Arborele filogenetic, caracterizat prin ramuri scurte și suport bootstrap scăzut, reflectă variabilitatea limitată a regiunii, cu gruparea strânsă a indivizilor purtători ai haplotipului H_1 și izolarea celor cu haplotipuri rare.

Arborii filogenetici construiți pentru regiunile intron 1 și 3'UTR ale genei MSTN, pe baza comparației dintre secvențele obținute și cele disponibile în NCBI, au oferit o imagine clară asupra poziționării genetice a indivizilor analizați.

Pentru intronul 1, topologia arborelui evidențiază un grad ridicat de conservare, cu clustere compacte care reunesc indivizii din toate cele trei rase (Cap Negru de Teleorman, Île de France și Suffolk). Majoritatea secvențelor proprii se grupează alături de înregistrări internaționale, la rase precum Najdi, Barki, Romney și Latvian Darkhead.

În regiunea 3'UTR, structura arborelui este mai ramificată și indică o variabilitate genetică mai mare. Cele mai multe secvențe din eșantion sunt apropiate de cele ale rasei Malpura, iar altele se grupează cu secvențe din rase europene precum Texel) și Romney. Această topologie reflectă atât un fond genetic comun între rase, cât și diferențieri punctiforme specifice unor indivizi care apar pe ramuri terminale, definind haplotipuri unice.

Asociere haplotipurilor identificate cu caracterele fenotipice

În capitolul 7 au fost evaluate asocierile dintre variabilitatea MSTN și performanțele de creștere și dezvoltare corporală. Pentru regiunea intron 1, analiza statistică a arătat că haplotipurile au influențat semnificativ caracterele de creștere timpurie. Indivizii din haplotipul H_1 au prezentat cele mai mari valori pentru greutatea la naștere (4,58 kg față de 3,86 kg la H_2 și 3,45 kg la H_3), cu diferențe distinct semnificative față de H_2 și H_3. Un profil similar s-a observat pentru greutatea la înțărare (33,9 kg la H_1, 26,21 kg la H_2, 30,85 kg la H_3) și sporul mediu zilnic 0–90 zile (325,81 g la H_1, 248,33 g la H_2, 304,45 g la H_3), unde comparațiile perechi au evidențiat diferențe foarte semnificative între H_1-H_2 și semnificative între H_2-H_3, în timp ce diferențele H_1-H_3 nu au fost semnificative. În ansamblu, haplotipurile care includ mutațiile din intron 1 (în special H_1 și parțial H_3) sunt asociate cu o dezvoltare timpurie mai bună comparativ cu haplotipul H_2, care corespunde secvenței comune cu cea de referință, care nu prezintă polimorfisme, susținând ideea că variațiile din intronul 1 pot modula indirect expresia MSTN și, implicit, performanțele de creștere.

În ceea ce privește caracterele morfometrice, aceleași haplotipuri din intron 1 nu au generat diferențe semnificative statistic, deși se conturează o tendință consistentă: indivizii cu H_3 au avut, în medie, valori mai mari pentru greutatea corporală (95,65

kg), perimetrul toracic (114,75 cm), lărgimea pieptului și a crupei ($\approx 29,25$ cm) și perimetrul fluierului (8,58 cm) decât indivizii H_1 și H_2, sugerând un posibil format corporal mai robust, care însă nu poate fi confirmat în condițiile eșantionului actual care este redus ca număr. Pentru regiunea 3'UTR, SNP-urile identificate au fost rare și concentrate la foarte puțini indivizi (3FCN, 4MCN, 5MI); deși acești purtători au avut adesea valori peste medie pentru greutatea corporală și sporul mediu zilnic, analizele nu au evidențiat efecte constante sau reproductibile nici asupra caracterelor de creștere, nici asupra celor morfometrice, variabilitatea observată fiind mai degrabă explicată prin alți factori genetici și de mediu. Per ansamblu, rezultatele susțin un rol mai clar al polimorfismelor din intron 1 al genei MSTN în determinismul caracterelor de creștere timpurie și un impact limitat al variațiilor 3'UTR asupra conformației corporale în rasele analizate.

Lucrarea contribuie la completarea bazei de date privind polimorfismele MSTN la ovine, având importanță științifică - prin evidențierea diversității genetice intra- și interrasă, și aplicativă - prin posibilitatea utilizării acestor markeri în selecția indivizilor cu potențial superior de creștere musculară. În ansamblu, cercetarea susține integrarea geneticii moleculare în programele de ameliorare a producției de carne la ovinele din România.