

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII
"ION IONESCU DE LA BRAD" DIN IAȘI
FACULTATEA DE INGINERIA RESURSELOR ANIMALE ȘI
ALIMENTARE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE INGINEREȘTI
DOMENIUL: ZOOTEHNIE
SPECIALIZAREA: GENETICĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Șteofil CREANGĂ**

**Doctorandă,
Mădălina Alexandra DAVIDESCU**

2021

**"ION IONESCU DE LA BRAD" UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
FACULTY OF FOOD AND ANIMAL SCIENCES
DOCTORAL SCHOOL OF ENGINEERING SCIENCES
DOCTORAL FIELD: ANIMAL SCIENCES
SPECIALIZATION: GENETICS**

DOCTORAL THESIS

PhD coordinator,

Univ. prof. PhD. Șteofil CREANGĂ

PhD student,

Mădălina Alexandra DAVIDESCU

2021

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII
"ION IONESCU DE LA BRAD" DIN IAȘI
FACULTATEA DE INGINERIA RESURSELOR ANIMALE ȘI
ALIMENTARE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE INGINEREȘTI
DOMENIUL: ZOOTEHNIE
SPECIALIZAREA: GENETICĂ**

**ESTIMAREA RELAȚIILOR FILOGENETICE ȘI CUANTIFICAREA
DIVERSITĂȚII GENETICE LA RASELE DE BOVINE SURĂ DE STEPĂ
ȘI PINZGAU, AFLATE ÎN PERICOL DE EXTINCȚIE ÎN ROMÂNIA**

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Șteofil CREANGĂ**

**Doctorandă,
Mădălina Alexandra DAVIDESCU**

2021

**"ION IONESCU DE LA BRAD" UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
FACULTY OF FOOD AND ANIMAL SCIENCES
DOCTORAL SCHOOL OF ENGINEERING SCIENCES
DOCTORAL FIELD: ANIMAL SCIENCES
SPECIALIZATION: GENETICS**

***„PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AND GENETIC DIVERSITY OF
ENDANGERED ROMANIAN CATTLE BREEDS, GREY STEPPE AND
PINZGAU”***

**PhD coordinator,
Univ. prof. PhD. Șteofil CREANGĂ**

**PhD student,
Mădălina Alexandra DAVIDESCU**

2021

A fost un drum lung, deloc ușor dar l-am parcurs gândindu-mă mereu că trebuie să ajung acolo unde îmi doresc... La fiecare oprire am întâlnit oameni...oameni de la care am cules sfaturi înțelepte și încurajări sau oameni care mi-au spus că drumul va fi mult prea greu ca eu să pot ajunge până la capăt! De la cei din urmă am învățat că sunt de neoprit iar puterea mea de a continua, astăzi își spune cuvântul!

Aduc mii de mulțumiri și mă înclin cu respect în fața celor care mi-au ghidat pașii și mi-au dăruit din cunoștințele lor pentru a încununa această teză de doctorat!

Coordonatorului acestui frumos proiect, d-lui prof. univ. dr. Șteofil Creangă îi mulțumesc pentru că a văzut în mine un om pe care îl poate iniția în tainele cercetării dar și pentru susținerea și îndrumarea pe parcursul celor trei ani de studiu. Cu respect și recunoștință pentru tot ceea ce am învățat prin prisma dumnealui, astăzi îi aduc mulțumire!

Mulțumesc pentru susținerea și înțelegerea venită din partea conducerii IULS-Iași și a Școlii doctorale, în mod special conducerii facultății FIRAA, d-lui decan Prof. univ. dr. Mircea Pop și întregului colectiv de cadre didactice care mi-au ghidat pașii încă din prima zi de studenție!

Cu prețuire și sincere mulțumiri mă îndrept către membrii comisiei de îndrumare, profesioniști de la care am acumulat cunoștințe ce-mi vor fi utile în carieră (Prof. univ. dr. Constantin Pascal, Prof. univ. dr. Vasile Maciuc, Conf. univ. dr. Daniel Simeanu și Șef. lucr. dr. Andrei Grădinaru)!

Mulțumesc de asemenea referenților din comisia de susținere publică a tezei, pentru acceptul de a-mi evalua teza de doctorat și a de a fi prezenți la această manifestare științifică!

Cu mulțumire și recunoștință mă îndrept către domnul prof. univ. dr. Lucian Gorgan din cadrul Facultății de Biologie, UAIC-Iași, căruia îi mulțumesc pentru suportul oferit în realizarea cercetărilor de laborator, pentru îndrumarea în elaborarea lucrării de disertație și pentru acceptul de a fi referent în cadrul comisiei de susținere publică a tezei!

Cu recunoștință și cordialitate mă îndrept spre a-i mulțumi d-lui dr. biolog Mitică Ciorpac, un bun coleg și un adevărat profesionist care m-a îndrumat pas cu pas în realizarea acestei teze de doctorat și m-a ancorat în tainele Geneticii moleculare!

Mulțumesc conducerii și colegilor din cadrul S.C.D.C.B., Dancu-Iași pentru suportul oferit în recoltarea probelor biologice de la rasa de bovine Sură de Stepă, pentru sfaturi și înțelegere!

Mulțumesc conducerii S.C.D.C.B., Târgu-Mureș pentru suportul oferit în recoltarea probelor biologice de la rasa de bovine Pinzgau!

În fața celor care pentru mine reprezintă totul, familia mea, mă înclin cu multă recunoștință pentru educația cu care am fost crescută și cu care am plecat la drum într-o lume atât de schimbătoare, pentru toată susținerea și pentru omul care sunt astăzi, datorită lor!

Tuturor celor menționați și nu numai, le mulțumesc și îi asigur de toată recunoștința mea!

„Ia seama că în viață trebuie să fii demn, trebuie să fii om și să nu îți fie frică de nimeni decât de Dumnezeu !”

Drd. Mădălina Alexandra Davidescu

CUPRINS

INTRODUCERE	7
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT	11

PARTEA I - STUDIU BIBLIOGRAFIC

Capitolul 1. CARACTERIZAREA BIOLOGICĂ A BOVINELOR.....	25
1.1. Evoluția și domesticirea bovinelor.....	25
1.2. Diversitatea și sistematica bovinelor	32
Capitolul 2. ORIGINEA ȘI FILOGENIA RASELOR DE BOVINE	
PODOLICE.....	35
2.1. Originea și filogenia rasei de bovine Sură de Stepă, din România	43
2.2. Originea și filogenia rasei de bovine Pinzgau, din România	48
Capitolul 3. STATUSUL DE RISC AL RASELOR DE BOVINE DIN	
EUROPA.....	52
3.1. Statusul de risc al rasei de bovine Sură de Stepă	52
3.2. Statusul de risc al rasei de bovine Pinzgau	55

PARTEA II - CERCETĂRI PROPRII

Capitolul 4. DESCRIEREA CADRULUI INSTITUȚIONAL DE DESFĂȘURARE	
A CERCETĂRIILOR.....	61
Capitolul 5. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI, MATERIALUL ȘI	
METODOLOGIA CERCETĂRII	64
5.1. Scopul și obiectivele studiului	64
5.2. Materialul biologic analizat	65
5.3. Metodologia cercetării.....	69
5.3.1. Recoltarea probelor biologice	70
5.3.2. Izolarea și cuantificarea ADN-ului total din probele de sânge.....	71
5.3.3. Amplificarea genei citocrom b și a regiunii de control mitocondrial d-loop	
prin tehnica PCR.....	74
5.3.4. Electroforeza în gel de agaroză pentru vizualizarea ampliconilor	76
5.3.5. Purificarea produșilor PCR prin coloane	78
5.3.6. Secvențierea ampliconilor	80
5.3.7. Analiza secvențelor pentru identificarea relațiilor filogenetice în cadrul	
populației de bovine analizate	81

Capitolul 6. CUANTIFICAREA GRADULUI DE DIVERSITATE GENETICĂ A INDIVIZILOR DIN RASA DE BOVINE SURĂ DE STEPĂ 85

6.1. Evaluarea diversității genetice a populației de bovine din rasa Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu-Iași, pe baza analizei pedigree-ului.....	85
6.2. Cuantificarea ADN-ului total și amplificarea secvențelor genice citocrom b și d-loop	94
6.2.1. Cuantificarea ADN-ului total	95
6.2.2. Amplificarea genică și validarea produșilor PCR prin tehnica de electroforeză în gel de agaroză	98
6.2.2.1. Amplificarea genică a citocromului b	99
6.2.2.2. Amplificarea genică a regiunii de control mitocondrial d-loop	101
6.2.2.3. Validarea produșilor PCR pentru citocrom b.....	104
6.2.2.4. Validarea produșilor PCR pentru regiunea de control mitocondrial d_loop	107
6.3. Analiza brută a secvențelor nucleotidice	109
6.3.1. Evaluarea frecvenței haplotipurilor prin analiza secvențelor genice ale citocromului b și a regiunii de control mitocondrial d-loop	109
6.3.2. Proporția bazelor azotate în secvențele nucleotidice pentru citocrom b și d-loop	110
6.3.3. Coeficientul de specificitate	115
6.3.4. Rețeaua de haplotipuri rezultată în urma analizei secvențelor genice ale citocromului b și d-loop	117
6.3.5. Dinamica ratei de evoluție a markerilor mitocondriali studiați	122
6.3.6. Expansiunea demografică și spațială a populației de bovine din rasa Sură de Stepă	127

Capitolul 7. CUANTIFICAREA GRADULUI DE DIVERSITATE GENETICĂ A INDIVIZILOR DIN RASA DE BOVINE PINZGAU..... 130

7.1. Cuantificarea ADN-ului total și amplificarea secvențelor genice citocrom b și d-loop	130
7.1.1. Cuantificarea ADN-ului total	130
7.1.2. Amplificarea genică și validarea produșilor PCR prin tehnica de electroforeză în gel de agaroză	133
7.1.2.1. Amplificarea genică a citocromului b	134
7.1.2.2. Amplificarea genică a regiunii de control mitocondrial d-loop	135
7.1.2.3. Validarea produșilor PCR pentru citocrom b.....	135
7.1.2.4. Validarea produșilor PCR pentru regiunea de control mitocondrial d_loop	136
7.2. Analiza brută a secvențelor nucleotidice	138

7.2.1. Evaluarea frecvenței haplotipurilor prin analiza secvențelor genice ale citocromului b și a regiunii de control mitocondrial d-loop	138
7.2.2. Proporția bazelor azotate în secvențele nucleotidice pentru citocrom b și d-loop	139
7.2.3. Coeficientul de specificitate	145
7.2.4. Rețeaua de haplotipuri rezultată în urma analizei secvențelor genice ale citocromului b și d-loop	147
7.2.5. Dinamica ratei de evoluție a markerilor mitocondriali studiați	151
7.2.6. Expansiunea demografică și spațială a indivizilor din rasa Pinzgau	155
Capitolul 8. RECOMANDĂRI DE MANAGEMENT	158
CONCLUZII.....	161
ELEMENTE DE ORIGINALITATE ALE TEZEI DE DOCTORAT	165
BIBLIOGRAFIE	167
ANEXA I.....	183
ANEXA II	185
ANEXA III.....	186
ANEXA IV	187
ANEXA V.....	191
ANEXA VI.....	193

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	9
SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS	17

PART I - BIBLIOGRAPHIC STUDY

Chapter 1. BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CATTLE BREEDS .	25
1.1. Evolution and domestication of cattle breeds	25
1.2. Diversity and systematics of cattle.....	32
Chapter 2. ORIGIN AND PHYLOGENY OF PODOLIAN CATTLE BREEDS.....	35
2.1. Origin and phylogeny of romanian Grey Steppe cattle breed	43
2.2. Origin and phylogeny of romanian Pinzgau cattle breed	48
Chapter 3. THE RISK STATUS OF EUROPEAN CATTLE BREEDS.....	52
3.1. The risk status of Grey Steppe cattle breed	52
3.2. The risk status of Pinzgau cattle breed	55

PART II: THE RESULTS OF OWN RESEARCH

Chapter 4. INSTITUTIONAL FRAMEWORK OF RESEARCH.....	61
Chapter 5. AIM OF THE STUDY, BIOLOGICAL MATERIAL AND METHODOLOGY OF RESEARCH.....	64
5.1. Purpose and objectives of the study	64
5.2. Biological material	65
5.3. Methodology of research	69
5.3.1. Collection of biological samples	70
5.3.2. Isolation and quantification of total DNA from blood samples	71
5.3.3. Amplification of cytochrome b and d-loop mitochondrial control region by PCR.....	74
5.3.4. Agarose gel electrophoresis for visualization of amplicons	76
5.3.5. Purification of PCR amplicons by columns	78
5.3.6. Amplicons sequencing	80
5.3.7. Sequence analysis to identify the phylogenetic relationships of the analyzed cattle population	81

Chapter 6. QUANTIFICATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF GREY STEPPE CATTLE BREED..... 85

6.1. Quantification of the genetic diversity of Grey Steppe cattle breed - S.C.D.C.B., Dancu-Iași, based on pedigree analysis	85
6.2. Quantification of total DNA and amplification of cytochrome b and d-loop gene sequences	95
6.2.1. Quantification of total DNA.....	95
6.2.2. Gene amplification and validation of PCR amplicons by agarose gel electrophoresis.....	98
6.2.2.1. Gene amplification of cytochrome b	99
6.2.2.2. Gene amplification of mt d-loop.....	101
6.2.2.3. Validation of PCR products for cytochrome b	104
6.2.2.4. Validation of PCR products for d_loop.....	107
6.3. Nucleotide sequence analysis	109
6.3.1. Evaluation of haplotype frequency by analysis of cytochrome b gene sequences and d-loop mitochondrial control region	109
6.3.2. Proportion of nitrogenous bases in nucleotide sequences for cytochrome b and d-loop	110
6.3.3. Specificity coefficient	115
6.3.4. The network of haplotypes resulting from the analysis of the cytochrome b and d-loop gene sequences	117
6.3.5. Dynamics of the evolution rate of the analyzed mitochondrial markers.	122
6.3.6. Demographic and spatial expansion of Grey Steppe cattle population...	127

Chapter 7. QUANTIFICATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF PINZGAU CATTLE BREED 130

7.1. Quantification of total DNA and amplification of cytochrome b and d-loop gene sequences	130
7.1.1. Quantification of total DNA.....	130
7.1.2. Gene amplification and validation of PCR amplicons by agarose gel electrophoresis.....	133
7.1.2.1. Gene amplification of cytochrome b	134
7.1.2.2. Gene amplification of mt d-loop.....	135
7.1.2.3. Validation of PCR products for cytochrome b	135
7.1.2.4. Validation of PCR products for d_loop.....	136
7.2. Nucleotide sequence analysis	138
7.2.1. Evaluation of haplotype frequency by analysis of cytochrome b gene sequences and d-loop mitochondrial control region	138
7.2.2. Proportion of nitrogenous bases in nucleotide sequences for cytochrome b and d-loop	139
7.2.3. Specificity coefficient	145

7.2.4. The network of haplotypes resulting from the analysis of the cytochrome b and d-loop gene sequences	147
7.2.5. Dynamics of the evolution rate of the analyzed mitochondrial markers.	151
7.2.6. Demographic and spatial expansion of Pinzgau cattle breed	155
Chapter 8. MANAGEMENT RECOMMENDATIONS.....	158
CONCLUSIONS.....	163
ORIGINALITY OF THE DOCTORAL THESIS	165
REFERENCES	167
ANNEXE I	183
ANNEXE II.....	185
ANNEXE III	186
ANNEXE IV.....	187
ANNEXE V	191
ANNEXE VI.....	193

INTRODUCERE

Din cele mai vechi timpuri, omenirea era preocupată de creșterea vitelor, la început pentru producția de carne și muncă în agricultură iar ulterior pentru producția de lapte (Acatincăi, 2004). Rasele de bovine autohtone sunt considerate patrimoniu socio-cultural și respectiv resurse genetice valoroase datorită adaptării lor la condițiile locale, aspecte importante pentru programele de reproducere și conservare (Groeneveld et al., 2010; Ilie et al., 2015).

Rasele de bovine indigene, românești sunt clasificate de numeroși cercetători în rase primitive (Sura de Stepă și Mocănița) și rase ameliorate (Bălțata Românească, Bălțata cu Negru Românească, Bruna, Pinzgau de Transilvania) (Creangă, Maciuc, 2010; Maciuc, 2006).

Până în anul 1850, se poate discuta de o proporție însemnată a două rase de bovine indigene, existente în țara noastră: Sura de Stepă (întâlnită îndeosebi în zonele de stepă și deal) și Mocănița (răspândită în zone muntoase). O amprentă favorabilă și decisivă în formarea acestor rase a fost reprezentată de condițiile de mediu care au contribuit la imprimarea însușirilor caracteristice de rusticitate, adaptabilitate la condiții severe de mediu, rezistență crescută la boli și longevitate (Creangă, Maciuc, 2010; Maciuc et al., 2009; Maciuc, 2006).

De-a lungul timpului, s-a constatat existența a patru varietăți din rasa Sură de Stepă (Moldovenească, Ialomițeană, Transilvăneană și Dobrogeană) denumite în funcție de zona de geografică a țării (Creangă, Maciuc, 2010).

Rasa de bovine Sură de Stepă din România aparține grupului de rase podolice, întâlnite și în prezent, în diferite zone ale Europei. Originea comună a acesteia, cu alte rase podolice (Iskar Grey, Bulgarian Grey, Istrian, Slavonian Podolian, Katerini, Hungarian Grey, Maremmana, Podolica, Turkish Grey, etc) (Teneva et al., 2005; Pariset, 2010) este strămoșul sălbatic *Bos taurus primigenius*, care a fost declarat dispărut în jurul secolului al XVI-lea.

În literatura de specialitate există numeroase studii pe baza ADNmt aparținând genului *Bos taurus* care au demonstrat prezența unui număr de trei haplogrupuri, structurate din punct de vedere geografic, respectiv: T1 întâlnit în Africa, T2 cu originea în Orientul Apropiat și Asia de Vest și T3 răspândit în Europa (Troy et al., 2001; Ginja et al., 2010; Edwards et al., 2007).

Încă din anul 1892, odată cu importul de noi rase, populația de Sură de Stepă din România se confruntă cu o scădere drastică a numărului de indivizi iar din anul 2000, Organizația pentru Alimentație și Agricultură (F.A.O.) a decis încadrarea rasei în statusul de risc "*în pericol de extincție*". Dacă în anul 2017, studiile arătau existența unui număr

de cca. 150 capete în zona Moldovei și Delta Dunării (Dascălu et al., 2017), în prezent, numărul exemplarelor din această rasă s-a redus considerabil.

Pe de altă parte, rasa Pinzgau prezintă de asemenea importanță majoră în sectorul zootehnic, fiind adaptată pentru creștere și exploatare în zonele cu altitudini între 400-1600 m, bogate în precipitații și pajiști naturale fertile, având rezistență și valorificând foarte bine furajele cu un conținut mare în celuloză (Cotos, 2005; Fisteag, 1956; Fisteag, 1958). Rasa Pinzgau din România se consideră a fi formată prin încrucișări între vaci din rasa Sură de Stepă și tauri Pinzgauer din Austria (Angelescu, 1974; Mang, 2011).

Referințele bibliografice revizuite (Georgescu et al., 1988; Bradley, Magee, 2006; Georgescu et al., 2008; Creangă et al., 2009; Bittante, 2011; Maretto et al., 2012), cu privire la rasele de bovine indigene, aflate în pericol de extincție în România, confirmă faptul că acestea sunt purtătoare a unui rezervor de gene valoroase care trebuie conservat prin aplicarea diferitelor biotehnologii de reproducere (Han și Bobiș, 2018).

Principalul nucleu de bovine din rasa Sură de Stepă se află la momentul actual inclus într-un program național de conservare genetică, derulat în cadrul Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor din Dancu, Iași, însumând un efectiv de 58 capete (37 femele și 21 masculi) în timp ce pentru rasa Pinzgau aflată în cadrul Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor din Târgu-Mureș se încearcă elaborarea unui program de conservare datorită pericolului de extincție în care se află rasa încă din anul 2000, în acel moment, înregistrându-se un număr de 1092 femele (Scherf, 2000).

Proiectul are ca scop principal cuantificarea variabilității genetice a celor două rase de bovine, din genul *Bos taurus*, prin analiza a doi markeri mitocondriali (citocrom b și d-loop), relevanți pentru studii avansate de diversitate genetică, filogenie, filogeografie moleculară și identificarea relațiilor de ordin taxonomic a speciilor reprezentative din cadrul subfamiliei *Bovinae*. Astfel, pe baza rezultatelor obținute, se vor formula unele recomandări cu privire la fluxul de gene, urmărindu-se creșterea variabilității genetice și reducerea efectelor consangvinizării. Totodată, prezentul studiu vine în completarea informațiilor existente, cu aspecte privind unele incertitudini taxonomice, dar și evidențierea a noi informații relative la istoria evolutivă a celor două rase.

Prima parte a tezei este realizată în urma consultării referințelor bibliografice din literatura de specialitate, cu privire la diversitatea genetică a bovinelor, pornind de la domesticirea și evoluția acestei specii iar cea de-a doua parte vine în completarea datelor existente cu propriile cercetări, clarificând astfel unele aspecte cu privire la incertitudinile taxonomice și istoria evolutivă a celor două populații de bovine din rasele Sură de Stepă și Pinzgau, din România.

INTRODUCTION

Since ancient times, humans were concerned about cattle breeding, first for meat production and work in agriculture and later for milk production (Acatincăi, 2004). Indigenous cattle breeds are considered socio-cultural heritage and valuable genetic resources due to their adaptation to local conditions, important aspects for reproduction and conservation programs (Groeneveld et al., 2010; Ilie et al., 2015).

Indigenous, Romanian cattle breeds are classified by many researchers into primitive breeds (Grey Steppe and Mocanita) and improved breeds (Romanian Spotted, Romanian Black Spotted, Brown, Pinzgauer) (Creangă, Maciuc, 2010; Maciuc, 2006). (Creangă, Maciuc, 2010; Maciuc, 2006).

Until 1850, we can discuss a majority proportion of two indigenous cattle breeds, existing in our country: Grey Steppe (found mainly in the steppe and hill areas) and Mocanita (widespread in mountainous areas). A favorable and decisive imprint in the formation of these breeds was represented by the environmental conditions that contributed to the printing of the characteristic features of rusticity, adaptability to severe environmental conditions, increased resistance to disease and longevity (Creangă, Maciuc, 2010; Maciuc et al., 2009; Maciuc, 2006).

Over time, it has been found the existence of four ecotypes of the Grey Steppe breed (Moldavian, Transylvanian, Dobrogean and Ialomițean) named according to the geographical area of the country (Creangă, Maciuc, 2010).

The Romanian Grey Steppe belongs to the group of podolian breeds, still found today, in different areas of Europe. The common origin of this breed with other podolian breeds (Iskar Gray, Bulgarian Gray, Istrian, Slavonian Podolian, Katerini, Hungarian Gray, Maremma, Podolica, Turkish Gray, etc.) (Teneva et al., 2005; Pariset, 2010) is the wild ancestor *Bos taurus primigenius*, which was declared extinct around the 16th century.

In the literature are numerous studies based on mtDNA belonging to the *Bos Taurus*, that have demonstrated the presence of a number of three haplogroups, geographically structured, respectively: T1 found in Africa, T2 originating in the Middle East and West of Asia and T3 widespread in Europe (Troy et al., 2001; Ginja et al., 2010; Edwards et al., 2007).

Since 1892, with the import of new breeds, the romanian Gray Steppe population has been facing a drastic decline in numbers, and since 2000, the Food and Agriculture Organization (F.A.O.) has decided to include the breed in risk status "endangered". If in 2017, studies showed the existence of a number of approx. 150 heads in the area of Moldova and the Danube Delta (Dascălu et al., 2017), currently, the number of specimens of this breed has decreased considerably.

However, Pinzgau breed is also of major importance in the livestock sector, being adapted for breeding and exploitation in areas with altitudes between 400-1600 m, rich in

rainfall and fertile natural meadows, having resistance and capitalizing very well on fodder with a content high in cellulose (Cotos, 2005; Fisteag, 1956; Fisteag, 1958). The Pinzgau breed from Romania is considered to be formed by crosses between cows from the Grey Steppe breed and Pinzgauer bulls from Austria (Angelescu, 1974; Mang, 2011).

Revised bibliographic references (Bradley, Magee, 2006; Georgescu et al., 2008; Creangă et al., 2009; Bittante, 2011; Maretto et al., 2012), regarding the endangered indigenous cattle breeds in Romania, confirm that they are carriers of a reservoir of valuable genes that must be preserved by applying different reproductive biotechnologies (Han and Bobiş, 2018).

The main nucleus of Grey Steppe cattle is currently included in a national genetic conservation program, within the Research Station for Cattle Breeding Dancu – S.C.D.C.B., Iaşi, totaling a herd of 58 heads (37 females and 21 males) while for the Pinzgau breed within the Research Station for Cattle Breeding Dancu – S.C.D.C.B., Târgu-Mureş, an attempt is made to develop a conservation program due to the danger of extinction in which the breed is since 2000, at that time, a number of 1092 females (Scherf, 2000).

The main purpose of the project is to quantify the genetic variability of the two breeds, from *Bos taurus*, by analyzing two mitochondrial markers (cytochrome b and d-loop), relevant for advanced studies of genetic diversity, phylogeny, molecular phylogeography and identification of taxonomic relationships order of the representative species within the *Bovinae* subfamily.

Thus, based on the results obtained, some recommendations will be formulated regarding the gene flow, increasing genetic variability and reduce the effects of inbreeding. At the same time, this study complements the existing information, with aspects regarding some taxonomic uncertainties, but also the highlighting of new information related to the evolutionary history of the two breeds.

The first part of the thesis is made after consulting the bibliographic references in the literature, on the genetic diversity of cattle, starting from the domestication and evolution of this species and the second part complements the existing data with their own research, thus clarifying aspects regarding the taxonomic uncertainties and the evolutionary history of the two cattle breeds from: Grey Steppe and Pinzgau, from our country.

REZUMAT

Titlul tezei de doctorat: Estimarea relațiilor filogenetice și cuantificarea diversității genetice la rasele de bovine Sură de Stepă și Pinzgau, aflate în pericol de extincție în România

Cuvinte cheie: *diversitate genetică; Sură de Stepă; Pinzgau; filogenie; variabilitate genetică; citocrom b; d-loop; markeri mitocondriali; secvențiere genică*

În ultimii 20 de ani, aproximativ 300 de rase din cca. 6000 aparținând unor specii diferite de animale de fermă au fost identificate de către Organizația Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură (F.A.O.) ca fiind dispărute sau în pericol de extincție. Principalii factori de risc sunt reprezentați de eroziunea genetică datorată însemințărilor artificiale, presiunea economică asupra fermierilor cu țintă directă asupra obținerii unor producții ridicate a materiilor prime de origine animală (lapte/carne) sau încrucișări între indivizi cu structură genetică diferită (Pariset et al., 2010). În categoria raselor de bovine aflate în pericol de extincție se încadrează două rase locale, respectiv Sura de Stepă și Pinzgau care fac obiectul acestui studiu.

Rasele de bovine indigene din România sunt clasificate de numeroși cercetători în rase primitive (Sura de Stepă și Mocănița) și rase ameliorate (Balțata Românească, Bălțata cu Negru Românească, Bruna, Pinzgau de Transilvania) (Creangă, Maciuc, 2010; Maciuc, 2006).

Rasa de bovine Sură de Stepă din România aparține grupului de rase podolice, întâlnite și în prezent, în diferite zone ale Europei. Originea comună a acestora, cu alte rase podolice (Iskar Grey, Bulgarian Grey, Istrian, Slavonian Podolian, Katerini, Hungarian Grey, Maremmana, Podolica, Turkish Grey, etc) (Teneva et al., 2005; Pariset, 2010) este strămoșul sălbatic *Bos taurus primigenius*, care a fost declarat dispărut în jurul secolului al XVI-lea, ultima turmă înregistrată fiind în Polonia, anul 1627 d.Hr. (Götherström et al., 2005; Pitt et al., 2018). Acesta a fost răspândit pe o mare parte din Eurasia și Africa de Nord în timpul a două mari epoci: Pleistocenul târziu și Holocenul timpuriu (Meadow, 1993; Clutton-Brock, 1990), dând naștere celor doi taxoni care au avut un rol crucial în domesticirea bovinelor de astăzi: *Bos taurus* și *Bos indicus* (Park et al., 2015) și care se diferențiază în primul rând prin prezența unei cocoase (specifice pentru *Bos indicus*). Din genul *Bos taurus* fac parte taurinele tipice din Europa, nord-estul Asiei și nordul Africii, adaptate îndeosebi climatului rece (Upadhyay et al., 2017). Numeroase studii au demonstrat faptul că rasele moderne de bovine europene din genul *Bos taurus* se caracterizează prin prezența haplogrupului mitocondrial T (Edwards et al., 2007; Scheu et al., 2008).

Rasa de bovine Pinzgau prezintă importanță majoră în sectorul zootehnic, fiind adaptată pentru creștere și exploatare în zonele cu altitudini de 400-1600 m, bogate în

precipitații și pajiști naturale fertile, având rezistență ridicată și valorificând foarte bine furajele cu un conținut mare în celuloză (Cotos, 2005; Fisteag, 1956; Fisteag, 1958). Rasa Pinzgau din România s-a format prin încrucișări între vaci din rasa Sură de Stepă și tauri Pinzgauer din Austria (Angelescu, 1974; Mang, 2011).

Referințele bibliografice revizuite (Bradley, Magee, 2006; Georgescu et al., 2008; Creangă et al., 2009; Bittante, 2011; Maretto et al., 2012), cu privire la rasele de bovine indigene, aflate în pericol de extincție în România, confirmă faptul că acestea sunt purtătoare a unui rezervor de gene valoroase care trebuie conservat prin aplicarea diferitelor biotehnologii de reproducere (Han și Bobiș, 2018).

Pentru elaborarea acestei teze de doctorat, s-au efectuat o serie de cercetări cu scopul de a evalua diversitatea genetică a celor două rase de bovine, Sură de Stepă și Pinzgau, aflate în pericol de extincție în România, prin analiza a doi markeri mitocondriali (citocrom b și d-loop), relevanți pentru studii de diversitate genetică, filogenie, filogeografie moleculară și identificarea relațiilor taxonomice între indivizi din diferite specii.

Prima parte a tezei este realizată în urma consultării referințelor bibliografice din literatura de specialitate, însumând un număr de 3 capitole care abordează aspecte cu privire la diversitatea genetică a bovinelor, pornind de la dovezile arheologice care atestă domesticirea și evoluția acestora, originea și filogenia raselor de bovine europene precum și analiza statusului de risc al raselor Sură de Stepă și Pinzgau din România.

A doua parte a tezei aduce o serie de completări a informațiilor existente în literatura de specialitate, cu privire la diversitatea genetică și clarificarea unor incertitudini taxonomice precum și evidențierea a noi considerente relative la istoria evolutivă a acestor rase din cadrul subfamiliei *Bovidae*, însumând un număr de 4 capitole.

Scopul cercetării a fost acela de a cuantifica variabilitatea genetică a raselor de bovine Sură de Stepă și Pinzgau și de a stabili relațiile de filogenie în cadrul subfamiliei *Bovinae*.

Planul de obiective a implicat parcurgerea mai multor etape de cercetare:

1. *Cuantificarea variabilității genetice a populațiilor de bovine din cele două rase, prin parcurgerea următoarelor etape:*

➤ identificarea haplotipurilor prezente atât în populația de bovine Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu-Iași cât și a populației din rasa Pinzgau din cadrul S.C.D.C.B, Târgu-Mureș, prin analiza secvențelor nucleotidice ale citocromului b și a regiunii de control mitocondrial d-loop;

➤ estimarea diversității genetice intra și interpopulaționale pe baza rezultatelor obținute în urma analizei celor doi markeri mitocondriali.

2. *Analiza filogenetică a raselor prin parcurgerea următoarelor etape:*

➤ compararea ratei de evoluție a markerilor mitocondriali studiați, cu rata de evoluție a genomului mitocondrial complet, atât la nivel de rasă, specie cât și la nivel de gen, prin analiza secvențelor genice rezultate în urma secvențierii;

➤ impactul markerilor mitocondriali în estimarea timpului de divergență.

Realizarea obiectivelor propuse în cadrul acestei cercetări a fost posibilă prin efectuarea unor analize în cadrul laboratoarelor specializate atât din țară cât și din străinătate.

În vederea cuantificării diversității genetice, au fost efectuate o serie de analize în cadrul *Laboratorului de Genetică Moleculară* al Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași.

Pentru secvențierea markerilor mitocondriali citocrom b și d-loop, probele de ADN au fost purificate și pregătite pentru a fi trimise în cadrul unui laborator specializat din Amsterdam-Olanda, "*Macrogen-Europe*" iar secvențele de ADN obținute au fost trimise în format electronic, sub forma unor fișiere de tip FASTA și a unor cromatograme specifice fiecărei secvențe analizate.

Pentru analiza secvențelor genice ale citocromului b și ale regiunii de control mitocondrial d-loop au fost utilizate o serie de programe de analiză genetică, enumerate și prezentate în continuare.

✚ Secvențierea produșilor PCR: secvențiere tip SANGER în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară al Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași și în cadrul Laboratorului Macrogen-Europe din Olanda;

✚ Alinierea cromatogramelor și corectarea secvențelor brute utilizând programul DNA Baser;

✚ Analiza secvențelor:

- ✓ Aliniere - programul Mega X;
- ✓ Model de substituție – programul jModelTest;
- ✓ Rețea de haplotipuri – programul PopArt;
- ✓ Construcția arborilor filogenetici de tipul NJ-Neighbor Joining, ML– maximum likelihood - programul SeaView;
- ✓ Genetică populațională – programele DnaSP 5.10 și R.

Analiza pedigree

Evaluarea diversității genetice a rasei de bovine Sură de Stepă pe baza analizei pedigree a fost realizată pe un număr de 171 indivizi.

Datele au fost mai întâi evaluate pentru fiecare individ și apoi utilizate pentru a calcula: intervalul între generații (L), gradul de rudenie (fIBD), gradul de rudenie nativă (fIBD | N), native genome equivalent (NGE), coeficientul de consangvinizare (F), dimensiunea efectivă a populației (Ne), diversitatea genetică, contribuția nativă bazată pe pedigree (NPED), contribuția genetică a altor rase și selecția optimă a contribuției, utilizând pachetul R optiSel (Wellmann, 2019).

Populația de bovine din rasa Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu a fost mărită în 2002, prin inseminarea in vitro a unui număr de 19 femele, utilizând material seminal de la 11 tauri. Strămoșii masculi folosiți pentru a construi toate cele 9 linii genetice, au fost indivizi de rasă pură, cu pedigree și fenotip specific Surei de Stepă. Pe de altă parte, exemplarele de sex feminin au prezentat diferite grade de incertitudine în

ceea ce privește statutul lor de rasă pură, unele dintre ele având caracteristici nespecifice rasei.

Inițial, dimensiunea populației a înregistrat o fază de creștere accentuată, cu un maximum de 88 indivizi identificați în anul 2007, urmând apoi o fază scurtă de scădere a numărului de exemplare (perioada 2007-2009) iar din 2010 este stabilă la aproximativ 58 de indivizi.

În general, raportul naștere-deces a fost pozitiv, cu o rată medie a natalității de 8,3 indivizi/an și o rată medie a mortalității de 6 indivizi/an. Durata medie de viață a fost de doar 6,4 ani însă intervalul mediu între generații a fost destul de ridicat, 12,75.

Valoarea ridicată a intervalului dintre generații este influențată de vârsta femelelor, care variază între 0 - 24 ani, în timp ce masculii au o durată de viață de cel mult 5 ani. Pe baza datelor din pedigree au fost urmărite complet un număr de 6 generații pentru femele și 5 pentru masculi. Integritatea informațiilor din pedigree a arătat valori relativ ridicate ($<0,85$) până la generația a doua, atât pentru masculi cât și pentru femele.

Coeficientul de consangvinizare a prezentat valori cuprinse în intervalul 0 - 0,39, în timp ce media a fost de 3,82% pentru indivizii vii și 2,3% per total indivizi analizați.

Populația actuală prezintă un nivel de diversitate genetică de $\sim 94\%$. Contribuția genetică a indivizilor cu origini neclare sau cu aspect nespecific al rasei a scăzut treptat, în timp, de la $\sim 50\%$ în 2002 la mai puțin de 3% în 2019.

Analiza secvențelor genice

Ca urmare a secvențierii genei citocrom b și a regiunii de control mitocondrial d-loop s-a constatat faptul că acești markeri prezintă o relevanță deosebită în evidențierea diferențelor genetice și stabilirea filogeniei dintre indivizii unei specii.

Prin analiza și interpretarea secvențelor genice specifice rasei de bovine Sură de Stepă, s-au identificat un număr de 4 haplogrupuri, cu diferite frecvențe (T1-3%, T2-19%, T3/T4-62% și P'QT-16%), în care au fost încadrați cei 32 indivizi studiați. Identificarea haplogrupului P'QT în urma analizei secvențelor nucleotidice, indică faptul că acest haplogrup este de tip ancestral, fiind specific bourului (*Bos taurus primigenius*), din care a evoluat această rasă de bovine.

În cadrul acestui haplogrup au fost identificați un număr de 5 indivizi, reprezentând un procent de 16% din totalul exemplarelor analizate, care ar putea fi utilizați în cadrul selecției, pentru încrucișări, cu scopul de a conserva rasa în stare pură.

Expansiunea demografică și spațială are la bază modelul de clacul *Mismatch distribution* și arată distribuția numărului de diferențe, identificate între perechile de haplotipuri. De regulă, această distribuție poate fi unimodală (specifică populațiilor care au suferit fie o expansiune demografică recentă, fie o expansiune spațială, caracterizată de un grad mare de migrație) sau multimodală (în cazul populațiilor aflate în echilibru demografic). Pentru populația de bovine Sură de Stepă a rezultat o distribuție multimodală atât în urma anliziei secvențelor nucleotidice ale citocromului b cât și a regiunii de control mitocondrial d-loop.

În cazul rasei Pinzgau, ca și în cazul rasei Sură de Stepă, s-a identificat frecvența haplogrupurilor pentru cei 24 indivizi, atât pe baza analizei secvențelor genice ale citocromului b cât și a regiunii de control mitocondrial d-loop. De asemenea, s-a calculat proporția celor patru baze azotate pentru ambele secvențe precum și coeficientul de specificitate pe baza raportului A+T/G+C. S-a urmărit în ansamblu, dinamica ratei de evoluție a celor doi markeri mitocondriali și expansiunea demografică a grupului de indivizi analizați.

Ca urmare a analizei secvențelor genice, spre deosebire de rasa Sură de Stepă, în cazul rasei Pinzgau au fost identificate 3 haplogrupuri, având frecvențe diferite (T1, T2 și T3). Cei 24 de indivizi au fost distribuiți în haplogrupurile corespunzătoare, astfel: 18 indivizi aparținând haplogrupului T3 (75%), 5 indivizi identificați în cadrul haplogrupului T2 (21%) și un singur individ reprezentant pentru haplogrupul T1 (4%).

În primele capitole s-a discutat despre dovezile arheologice care atestă faptul că bovinele au trecut prin două mari evenimente de domesticire, respectiv, primul eveniment care a avut loc în sud-vestul Asiei, dând naștere bovinelor cu descendență în *Bos primigenius* și al doilea din care a evoluat zebu sau *Bos indicus* (Loftus et. al., 1994; Loftus et. al., 1999; Troy et. al., 2001).

Analizele ADN-ului mitocondrial la rasele de bovine din Europa au demonstrat apartenența majorității acestora la haplogrupul T, cu o estimare a timpului de divergență de ~ 16 mii ani. Acest haplogrup T, este divizat în două subclade surori, respectiv T1-T2-T3 (în care au fost identificați o mare parte din indivizii aparținând celor două rase) și subcladele T4-T5 (Mannen et. al., 2004; Bradley et. al., 1996).

Haplogrupurile T și P'QT, identificate la rasa Sură de Stepă au fost implicate în același proces de domesticire în Cornul Abundenței (Achilli et. al., 2008; Achilli et. al., 2009).

Conform expansiunii demografice, evidențiată pe baza modelului de calcul *Mismatch distribution* se poate observa distribuția numărului de diferențe ce se regăsesc între perechile de haplotipuri. Indivizii din rasa Pinzgau au prezentat o distribuție de tip multimodal, rezultată atât din analiza secvențelor nucleotidice ale citocromului b cât și a regiunii de control mitocondrial d-loop, ceea ce arată un echilibru demografic.

Rezultatele investigațiilor privind cuantificarea variabilității genetice a celor două rase de bovine Sură de Stepă și Pinzgau din România și identificarea relațiilor filogenetice în cadrul subfamiliei *Bovinae* au condus la formularea următoarelor concluzii:

- cuantificarea spectrofotometrică a ADN-ului total a validat cantitativ și calitativ etapa de izolare a acidului dezoxiribonucleic făcând posibilă trecerea la următoarele etape de analiză;

- prin migrarea produșilor PCR în gel de agaroză, s-a constatat faptul că nu au avut loc amplificări nespecifice și nici nu au avut loc contaminări iar primerii utilizați pentru amplificare au prezentat un grad ridicat de specificitate pentru cei doi markeri mitocondriali analizați;

- ca urmare a secvențierii markerilor mitocondriali citocrom b și d-loop s-a constatat faptul că aceștia prezintă o relevanță deosebită în evidențierea diferențelor genetice și stabilirea filogeniei dintre indivizii unei specii;

- analizele moleculare efectuate privind diversitatea genetică, expansiunea demografică și spațială a celor două rase de bovine din România, demonstrează sustenabilitatea spațio-temporală a indivizilor, aspect favorabil procesului de reintroducere în libertate a acestora;

- cercetările filogenetice efectuate au demonstrat că pentru a cuantifica corect relațiile filogenetice din cadrul subfamiliei *Bovinae* și pentru a estima timpul de divergență, nu este suficientă folosirea unui arbore cu suport topologic ridicat, acesta nefiind capabil să estimeze corect vârsta cladelor ci analiza unor markeri mitocondriali concatenați și analizați individual pentru rasele de bovine incluse în studiu;

- prin investigațiile moleculare efectuate s-a constatat că gena citocrom b reprezintă markerul mitocondrial cel mai capabil să evalueze corect relațiile filogenetice din cadrul subfamiliei *Bovinae*.

Rezultatele cercetării, pot contribui la îmbunătățirea programului de conservare al raselor Sură de Stepă și Pinzgau și la completarea informațiilor actuale cu privire la diversitatea genetică a acestora, reprezentând un instrument valoros pentru eforturile privind conservarea acestor rezerve de gene aflate în pericol de extincție.

Păstrarea genofondului acestor rase necesită aplicarea unor măsuri suplimentare și alocarea unor resurse financiare considerabile. Pentru a concepe strategii de conservare adecvate și eficiente, trebuie luate în considerare o serie de cunoștințe exacte despre toți indivizii existenți în cadrul unei populații. Prin urmare, se recomandă cercetări suplimentare, care să aibă în vedere analiza genomului mitocondrial complet, a cromozomului Y (partea paternă), a microsateliților, analiza ADN-ului extras de la fosile sau resturi osoase aparținând taurinelor *Bos taurus*, asigurând astfel o mai bună înțelegere a structurii genetice reale și a istoriei anterioare a populației studiate.

Un aspect important pentru a asigura un program eficient de conservare al celor două rase îl reprezintă conservarea materialului genetic prin criogenarea probelor (țesut și ADN genomic) și crearea unei baze de date cu probele arhivate, parametrii fenotipici și profilul genotipic al fiecărui individ, astfel încât să se asigure propagarea rasei. Analizele genomice, aplicarea biotehnicilor de reproducere și crearea unei bănci de material genetic vor contribui la o conservare activă și la eliminarea raselor din lista celor aflate în pericol de extincție precum și la dezvoltarea orientărilor specifice, sub aspect economic, genetic și cultural.

SUMMARY

The title of the doctoral thesis: „Phylogenetic relationships and genetic diversity of endangered romanian cattle breeds, Grey Steppe and Pinzgau”

Key words: *genetic diversity; Grey Steppe cattle breed, Pinzgau cattle breed; phylogeny; genetic variability; cytochrome b; d-loop; mitochondrial markers; gene sequencing*

In the last 20 years, about 300 breeds of approx. 6,000 belonging to different species of animals have been identified by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (F.A.O.) as endangered.

The main risk factors are genetic erosion due to artificial insemination, economic pressure on farmers with a direct target on large milk or meat production or crossbreeding between individuals with different genetic structure (Pariset et al., 2010).

The category of endangered cattle breeds includes two local breeds, namely Grey Steppe and Pinzgau, which are the subject of this study.

The indigenous cattle breeds from Romania are classified by numerous researchers in primitive breeds (Grey Steppe and Mocanita) and improved breeds (Romanian Spotted, Romanian Black Spotted, Brown, Pinzgau) (Creangă, Maciuc, 2010; Maciuc, 2006).

The romanian Grey Steppe cattle breed belongs to the group of podolian breeds, still found in different areas of Europe. Its common origin, with other Podolian breeds (Iskar Gray, Bulgarian Gray, Istrian, Slavonian Podolian, Katerini, Hungarian Gray, Maremma, Podolica, Turkish Gray, etc.) (Teneva et al., 2005; Pariset, 2010) is the wild ancestor *Bos taurus primigenius*, which was become extinct around the 16th century, the last herd recorded being in Poland, in 1627 AD. (Götherström et al., 2005; Pitt et al., 2018).

It was widespread in Eurasia and North Africa during two major epochs: the *Late Pleistocene* and *Early Holocene* (Meadow, 1993; Clutton-Brock, 1990), giving birth to the two ancestors who played a crucial role in the domestication of cattle: *Bos taurus* and *Bos indicus* (Park et al., 2015) and which differs primarily by the presence of a hump (specific for *Bos indicus*).

Bos taurus includes typical cattle from Europe, Northeast Asia and North Africa, adapted mainly to the cold climate (Upadhyay et al., 2017). Numerous studies have shown that modern cattle breeds from Europe, are characterized by the mitochondrial haplogroup T (Edwards et al., 2007; Scheu et al., 2008).

The Pinzgau cattle breed is adapted for breeding and exploitation in areas with altitudes of 400-1600 m, rich in rainfall and fertile natural meadows, with high resistance and capitalizing very well on feed with a high cellulose content (Cotos, 2005; Fisteag, 1956; Fisteag, 1958). The romanian Pinzgau breed was formed by crosses between cows from the Grey Steppe breed and Pinzgauer bulls from Austria (Angelescu, 1974; Mang, 2011).

Revised bibliographic references (Bradley, Magee, 2006; Georgescu et al., 2008; Creangă et al., 2009; Bittante, 2011; Maretto et al., 2012), regarding the endangered indigenous cattle breeds in Romania, confirm that they are carriers of a reservoir of valuable genes that must be preserved by applying different reproductive biotechnologies (Han and Bobiş, 2018).

For the elaboration of this doctoral thesis, a series of researches were carried out in order to evaluate the genetic diversity of the two cattle breeds, Grey Steppe and Pinzgau, which are endangered in Romania, by analyzing two mitochondrial markers (cytochrome b and d-loop), relevant for studies of genetic diversity, phylogeny, molecular phylogeography and identification of taxonomic relationships between individuals of different species.

The first part of the thesis is made after consulting the bibliographic references in the literature, summing up a number of 3 chapters that present aspects on the genetic diversity of cattle, starting from archaeological evidence attesting their domestication and evolution, origin and phylogeny of European breeds and analysis of the risk status of romanian Grey Steppe and Pinzgau.

The second part of the thesis brings a series of additions to the existing information in the literature on genetic diversity and clarification of taxonomic uncertainties and highlighting new considerations related to the evolutionary history of these breeds within the subfamily *Bovidae*, totaling a number of 4 chapters.

The aim of this research was to quantify the genetic variability of Grey Steppe and Pinzgau cattle breeds and to establish phylogenetic relationships within the *Bovinae* subfamily.

The objective plan includes several stages of research:

1. *Quantification of the genetic variability of Grey Steppe and Pinzgau cattle breeds by performing the following steps:*

- identification of haplotypes present in the Grey Steppe population (S.C.D.C.B., Dancu-Iași) and in the Pinzgau population (S.C.D.C.B., Târgu-Mureș), by analyzing the nucleotide sequences of cytochrome b and d-loop mitochondrial control region;
- estimation of intra and inter-population genetic diversity based on the results obtained from the analysis of the two mitochondrial markers.;

2. *Phylogenetic analysis of breeds by following the following steps:*

- comparing the evolution rate of mitochondrial markers, with the evolution rate of the complete mitochondrial genome, by analyzing the gene sequences resulting from sequencing;
- the impact of mitochondrial markers in estimating the time of divergence.

The achievement of the objectives proposed in this research was possible by performing analysis in specialized laboratories both in the country and abroad.

To quantify the genetic diversity, a series of analyzes were performed within the Molecular Genetics Laboratory of the Faculty of Biology, “Alexandru Ioan Cuza” University of Iasi.

For the sequencing of the cytochrome b and d-loop mitochondrial markers, DNA samples were purified and prepared to be sent to a specialized laboratory in Amsterdam-

Netherlands, "Macrogen-Europe" and the DNA sequences were sent in electronic format, in the form of FASTA files and chromatograms specific to each analyzed sequence.

A series of genetic analysis programs, listed and presented below, was used to analyze the gene sequences of cytochrome b and d-loop mitochondrial control region.

✚ Sequencing of PCR products: SANGER type sequencing within the Molecular Genetics Laboratory of the Faculty of Biology, "Alexandru Ioan Cuza" University of Iași and within the Macrogen-Europe Laboratory in the Netherlands;

✚ Chromatogram alignment and sequence correction using the DNA Baser program;

✚ Sequence analysis:

- Alignment - Mega X program;
- Substitution model - jModelTest program;
- Haplotypes Network - PopArt program;
- Construction of phylogenetic trees (NJ-Neighbor Joining and ML - maximum likelihood) SeaView program;
- Population genetics analysis- DnaSP 5.10 and R programs.

Pedigree analysis

The evaluation of genetic diversity of Grey Steppe cattle breed based on the pedigree analysis was performed on a number of 171 individuals.

The data were first evaluated for each individual and then used to calculate: generation interval (L), kinship (fIBD), native kinship (fIBD | N), native genome equivalent (NGE), inbreeding coefficient (F), effective population size (Ne), genetic diversity, pedigree-based native contribution (NPED), genetic contribution of other breeds and optimal contribution selection, using the R optiSel package (Wellmann, 2019).

The Grey Steppe population from S.C.D.C.B., Dancu was increased in 2002, by in vitro insemination of a number of 19 females, using semen from 11 bulls. The male ancestors used to build all 9 genetic lines were pure bred individuals with a pedigree and phenotype specific to Grey Steppe. On the other hand, female specimens presented varying degrees of uncertainty as to their purebred status, some of them having non-breed-specific characteristics.

Initially, the population size registered a phase of accentuated growth, with a maximum of 88 individuals identified in 2007, followed by a short phase of the decrease in the number of specimens (period 2007-2009) and from 2010, it is stable at approximately 58 individuals.

Overall, the birth-death ratio was positive, with an average birth rate of 8.3 individuals/year and an average mortality rate of 6 individuals/year. The average lifespan was only 6.4 years but the average interval between generations was quite high, 12.75.

The high value of the interval between generations is influenced by the age of the females, which varies between 0 - 24 years, while the males have a lifespan of no more than 5 years. Based on pedigree data, 6 generations for females and 5 for males was completely followed. The integrity of the pedigree information showed relatively high values (< 0.85) until the second generation, both for males and females.

The inbreeding coefficient showed values in the range 0 - 0.39, while the average was 3.82% for living individuals and 2.3% for total individuals analyzed.

The current population has a level of genetic diversity of ~ 94%. The genetic contribution of individuals with unclear or nonspecific origins has gradually decreased over time from ~ 50% in 2002 to less than 3% in 2019.

Gene sequence analysis

Following the sequencing of the cytochrome b gene and d-loop mitochondrial control region, it was found that these markers are of particular relevance in highlighting genetic differences and establishing phylogeny between individuals of a species.

By analyzing and interpreting the gene sequences specific to Grey Steppe cattle breed, a number of 4 haplogroups were identified, with different frequencies (T1-3%, T2-19%, T3 / T4-62% and P'QT-16 %), in which the 32 individuals studied were included. The identification of the P'QT haplogroup following the analysis of nucleotide sequences, indicates that this haplogroup is of ancestral type, being specific to the ox (*Bos taurus primigenius*), from which this breed of cattle evolved.

Within this haplogroup, a number of 5 individuals were identified, representing a percentage of 16% of the total analyzed specimens, which could be used in the selection, for crosses, in order to preserve the purebred breed.

Demographic and spatial expansion is based on the *Mismatch distribution model* and shows the distribution of the number of differences, identified between pairs of haplotypes. As a rule, this distribution can be unimodal (specific to populations that have undergone either a recent demographic expansion or a spatial expansion, characterized by a high degree of migration) or multimodal (in the case of populations in demographic equilibrium). For the Grey Steppe cattle population, a multimodal distribution resulted both from the analysis of the nucleotide sequences of cytochrome b and d-loop mitochondrial control region.

In the case of Pinzgau breed, as in the case of the Grey Steppe breed, the haplogroup frequency for the 24 individuals was identified, both based on the analysis of the cytochrome b gene sequences and d-loop mitochondrial control region. The proportion of the four nitrogenous bases for both sequences and the specificity coefficient was also calculated based on the A + T / G + C ratio. The dynamics of the evolution rate of the two mitochondrial markers and the demographic expansion of the group of analyzed individuals were followed.

As a result of the analysis of gene sequences, unlike the Grey Steppe breed, in the case of Pinzgau breed, 3 haplogroups were identified, having different frequencies (T1, T2 and T3). The 24 individuals were distributed in the corresponding haplogroups, as follows: 18 individuals belonging to the T3 haplogroup (75%), 5 individuals identified within the T2 haplogroup (21%) and one individual representative for the T1 haplogroup (4%).

The first chapters discussed archaeological evidence that cattle went through two major domestication events, namely the first event in southwest Asia, giving birth to cattle

with offspring in *Bos primigenius* and the second of which evolved zebu or *Bos indicus* (Loftus et. al., 1994; Troy et. al., 2001).

Mitochondrial DNA analyzes in european cattle breeds showed that most of them belonged to the T haplogroup, with an estimated the time of divergence of ~ 16 thousand years. This T haplogroup is divided into two sister subclades, namely T1-T2-T3 (in which a large part of the individuals belonging to the two breeds were identified) and the T4-T5 subclades (Mannen et. Al., 2004; Bradley et. al., 1996).

Haplogroups T and P'QT, identified in the Grey Steppe breed, were involved in the same domestication process in the Fertile Crescent (Achilli et. Al., 2008; Achilli et. Al., 2009).

Pinzgau individuals presented a multimodal distribution, resulting from both the analysis of the nucleotide sequences of the cytochrome b and d-loop mitochondrial control region, which shows a demographic balance.

The results of investigations regarding the quantification of the genetic variability of the two romanian cattle breeds, Grey Steppe and Pinzgau and identification of phylogenetic relations within the subfamily *Bovinae* led to the formulation of the following conclusions:

- the spectrophotometric quantification of total DNA, validated quantitatively and qualitatively the isolation of deoxyribonucleic acid, making it possible to move on to the next stages of analysis;
- by migrating the agarose gel PCR products, it was found that there were no foreign amplifications and no contamination and the primers used for amplification showed a high degree of specificity for the two mitochondrial markers were analyzed;
- following the sequencing of the cytochrome b and d-loop mitochondrial markers, it was found that they are of particular relevance in highlighting genetic differences and establishing phylogeny between individuals of a species;
- the molecular analyzes performed regarding the genetic diversity, the demographic and spatial expansion of the two romanian cattle breeds, demonstrate the spatio-temporal sustainability of the individuals, a favorable detail for the process of their reintroduction in freedom;
- phylogenetic research has shown that in order to correctly quantify phylogenetic relationships within the *Bovinae* subfamily and to estimate time of divergence, it is insufficient to use a tree with high topological support, which can not correctly estimate clade age but to analyze concatenated mitochondrial markers and analyzed individually for the breeds included in the study;
- through the molecular investigations performed, it was found that the cytochrome b gene represents the mitochondrial marker most able to correctly evaluate the phylogenetic relationships within the *Bovinae* subfamily.

The results of this research can contribute to the improvement of the conservation program of Grey Steppe and Pinzgau breeds and to the completion of current information

on their genetic diversity, representing a valuable tool for efforts to conserve these endangered gene reserves.

Maintaining the genetic background of these breeds requires the application of additional measures and the allocation of considerable financial resources. To design appropriate and effective conservation strategies, a set of accurate knowledge about all existing individuals in a population must be taken into account. Therefore, further research is recommended to consider the analysis of the complete mitochondrial genome, the Y chromosome (paternal), microsatellites, the analysis of DNA extracted from fossils to *Bos taurus* bulls, thus ensuring a better understanding of the real genetic structure and the previous history of the studied population.

An important aspect to ensure an efficient conservation program of the two breeds is the conservation of genetic material by cryogenizing the samples (tissue and genomic DNA) and creating a database with archived samples, phenotypic parameters and genotypic profile of each individual, so to ensure the spread of the breed. Genomic analysis, the application of reproductive biotechnology and the creation of a bank of genetic material will contribute to an active conservation and elimination of breeds from the list of endangered cattle and the development of specific guidelines, in economic, genetic and cultural terms.

PARTEA I: STUDIU BIBLIOGRAFIC

PART I: BIBLIOGRAPHIC STUDY

CAPITOLUL 1

CARACTERIZAREA BIOLOGICĂ A BOVINELOR

CHAPTER 1

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CATTLE BREEDS

În ultimii 20 ani, aproximativ 300 de rase din cca. 6000 aparținând unor specii diferite de animale de fermă au fost identificate de către Organizația Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură (F.A.O.) ca fiind dispărute sau în pericol de extincție. Principalii factori de risc sunt reprezentați de eroziunea genetică datorată însemnărilor artificiale, presiunea economică asupra fermierilor cu țintă directă asupra obținerii unor producții ridicate a materiilor prime de origine animală (lapte/carne) sau încrucișări între indivizi cu structură genetică diferită (Pariset et al., 2010). În categoria raselor de bovine aflate în pericol de extincție se încadrează și Rasa de Stepă care face obiectul acestui studiu.

Rasa Sură de Stepă face parte din categoria celor mai vechi rase de bovine indigene, întâlnite în Europa, aparținând genului *Bos taurus primigenius* și având un strămoș comun cu celelalte rase de bovine europene (Andaluza, Romagnola, Zamorana, Salers, Podolica, Ukrainian Grey Steppe, etc.). Această rasă face parte din grupul raselor podolice (*Podolian Grey Steppe*). Mulți cercetători susțin faptul că rasele podolice își au originea în câmpiile ucrainene (stepa podoliană), ulterior răspândindu-se în regiunea Balcanilor și a Mediteranei, formând în timp noi rase locale (Di Lorenzo et al., 2018).

Caracteristice rasei de bovine Sură de Stepă sunt calitățile biologice deosebite prin care s-a remarcat ca rasă autohtonă de-a lungul timpului (adaptabilitate și rezistență crescută la boli și condiții severe de climă și habitat, rusticitate și longevitate) (Creangă, Maciuc, 2010).

1.1. Evoluția și domesticirea bovinelor

Alături de ovine și caprine, conform primelor dovezi arheologice, bovinele au fost domesticate în urmă cu aproximativ 10.000 de ani (Figura 1.1. A.) (Zeder et al., 2006).

Domesticirea bovinelor acum 10 mii de ani a reprezentat un pas fundamental în dezvoltarea umanității (Clutton-Brock, 1999; Diamond, 2002), ducând la modificări ample ale dietei, comportamentului și structurii socio-economice a multor populații (Bellwood, 2004). Din punct de vedere genetic, procesul de domesticire a animalelor poate fi reconstituit prin analize filogeografice, având la bază atât date de la nivelul genomului nuclear cât și mitocondrial (Groeneveld et al., 2010) însă studiile moleculare

asupra bovinelor s-au concentrat pe analiza ADN-ului mitocondrial (ADNmt) (Achilli et al., 2008; 2009).

Strămoșul sălbatic al tuturor vitelor domesticite este *Bos primigenius* (Zeuner, 1963; Hassanin, Ropiquet, 2005), fiind în prezent o specie extinctă, ultima turmă înregistrată fiind găsită în 1627 d.Hr. în Polonia (Götherström et al., 2005; Pitt et al., 2018). Acesta a fost răspândit pe o mare parte din Eurasia și Africa de Nord în timpul a două mari epoci: Pleistocenul târziu și Holocenul timpuriu (Meadow, 1993; Clutton-Brock, 1990), dând naștere celor doi taxoni (Figura 1.1. C.) care au avut un rol crucial în domesticirea bovinelor de astăzi: *Bos taurus* și *Bos indicus* (Park et al., 2015) și care se diferențiază în primul rând prin prezența unei cocoase (specifice pentru *Bos indicus*).

Din genul *Bos taurus* fac parte taurinele tipice din Europa, nord-estul Asiei și nordul Africii, adaptate îndeosebi climatului rece (Upadhyay et al., 2017). Numeroase studii au demonstrat faptul că rasele moderne de bovine europene din genul *Bos taurus* se caracterizează prin prezența haplotipului mitocondrial T (Edwards et al., 2007; Scheu et al., 2008).

Pe de altă parte, cu privire la *Bos indicus* (Zebu), studiile arată că India este centrul de origine, ulterior răspândindu-se în Africa și Asia de sud-est (Naik, 1978), în perioada 2250-2000 î.Hr., ulterior identificându-se bovine Zebu împrăștiate în toată India. Încă de pe vremea civilizației Harappan din valea Indusului au fost găsite figuri și picturi care reprezentau bovine cocoșate, semănând cu strămoșul *Bos Primigenius*. Allchin (1969) consideră că două grupuri separate de oameni au domesticit animalele în India: un grup format din oameni care se ocupau cu vânătoarea, în timpul epocii de piatră, împrăștiat în toată țara, care a domesticit unele dintre speciile locale de animale și un al doilea grup de păstori nomazi veniți din Asia de vest. Taurul Zebu descris pe sigiliul Harappan seamănă cu vitele moderne din Gujarat, având un corp puternic și coarne masive. Unele picturi rupestre din cele mai vechi roci și teracotă neolitică, ilustrează bovine Zebu cu o construcție ușoară, cocoasă mare și oarecum diferite de vitele din nord (, 1963).

Vitele domesticite s-au răspândit în toată Europa odată cu migrația primilor fermieri. Pe măsură ce aceștia s-au așezat în regiunile care adăposteau taurinele native europene, au avut loc încrucișări sporadice între taurinele domestice și cele native, care au persistat în unele regiuni până în Evul Mediu.

Conform arborelui taxonomic realizat de Linnaeus (1758), numit și "părintele taxonomiei", *Bos taurus* și *Bos indicus* se încadrează astfel:

Regnul: Animalia,	Regnul: Animalia,
Subregnul: Metazoa,	Subregnul: Metazoa,
Încręgătura: Chordata,	Încręgătura: Chordata,
Subîncręgătura: Vertebrata,	Subîncręgătura: Vertebrata,
Clasa: Mammalia,	Clasa: Mammalia,
Subclasa: Eutheria,	Subclasa: Eutheria,
Ordinul: Artiodactyla (Paricopitatae)	Ordinul: Artiodactyla (Paricopitatae)
Subordinul: Ruminantia	Subordinul: Ruminantia
Familia: Bovidae	Familia: Bovidae
Genul: <i>Bos</i>	Genul: <i>Bos</i>
<u>Specia:</u> <i>Bos taurus</i>	<u>Specia:</u> <i>Bos indicus</i>

Pe baza dovezilor arheologice și genomice, Taberlet et al. (2011) demonstrează prezența a două haplogrupuri mitocondriale (Figura 1.1.), interpretată ca o indicație a două evenimente principale de domesticire, primul în Cornul abundenței, perioada neoliticului pentru *B. taurus* și cel de-al doilea, cu 1500 de ani mai târziu, în subcontinentul indian, Valea Indului (Pakistanul de astăzi), dând naștere bovinelor indiene din subspecia *Bos indicus*, numite și zebu. Procesul de hibridizare extinsă având loc, ulterior, în Africa (Meadow, 1993; Bradley et al., 2006; Pitt, 2019).

Un alt studiu elaborat de cercetătorul Hiendleder et al. (2008) care a avut ca scop principal analiza unor secvențe ale genomului mitocondrial complet (16338 pb și respectiv 16339 pb) pentru *B. taurus* și *B. indicus* a indicat faptul că cele două linii de bovine s-au separat acum 1,7-2,0 milioane de ani. Analizele filogenetice comparative între 18 secvențe noi și 130 raportate anterior la *B. taurus* și *B. indicus*, cu date de la 32 de exemplare ale bourului sălbatic (*Bos primigenius*), au identificat o descendență maternă pe 4 linii genetice. Haplotipurile *B. primigenius* au fost prezente în toate, cu excepția liniei *B. indicus* și a unei secvențe de la *B. taurus* grupată cu haplotipurile P ale *B. primigenius*.

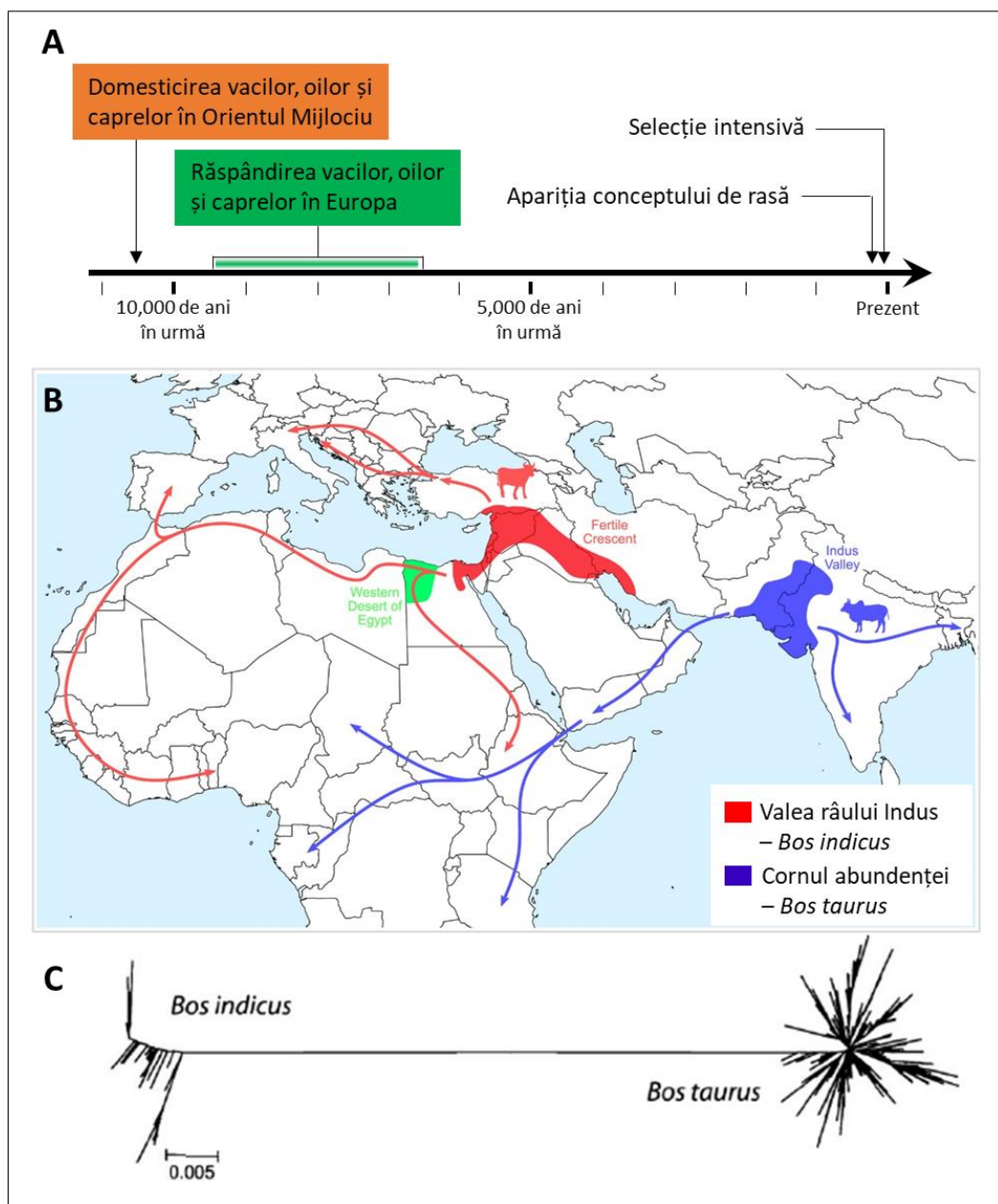


Figura 1.1. Date arheologice cu privire la domesticirea bovinelor, ovinelor și caprinelor (Taberlet, et al., 2008; Hiendleder et al., 2008)

Figure 1.1. Archaeological data on the domestication of cattle, sheep and goats (Taberlet, et al., 2008; Hiendleder et al., 2008)

Achilli et al. (2009) au realizat un studiu amplu cu privire la originea taurinelor reflectată de analiza genomului mitocondrial. Prin cercetarea unor regiuni de control a ADNmt asociat taurinelor din numeroase rase europene, s-a confirmat o grupare generală a acestora în cadrul haplogrupurilor T1, T2 și T3, comune strămoșilor din Orientul

Apropiat, dar s-au identificat totodată, opt regiuni ADNmt (1,3%) care nu s-au încadrat în haplogrupul T.

Secvențierea întregului genom mitocondrial a condus la ipoteza că patru din cele opt regiuni ADNmt au format un nou haplogrup (haplogrupul R) care, după bifurcația ce a dat naștere a două linii: taurine și zebu, constituie cea mai veche scindare cunoscută în filogenia ADNmt a genului *B. primigenius* iar celelalte patru regiuni DNAmT au format haplogrupul Q, descoperit mai recent (Figura 1.2.).

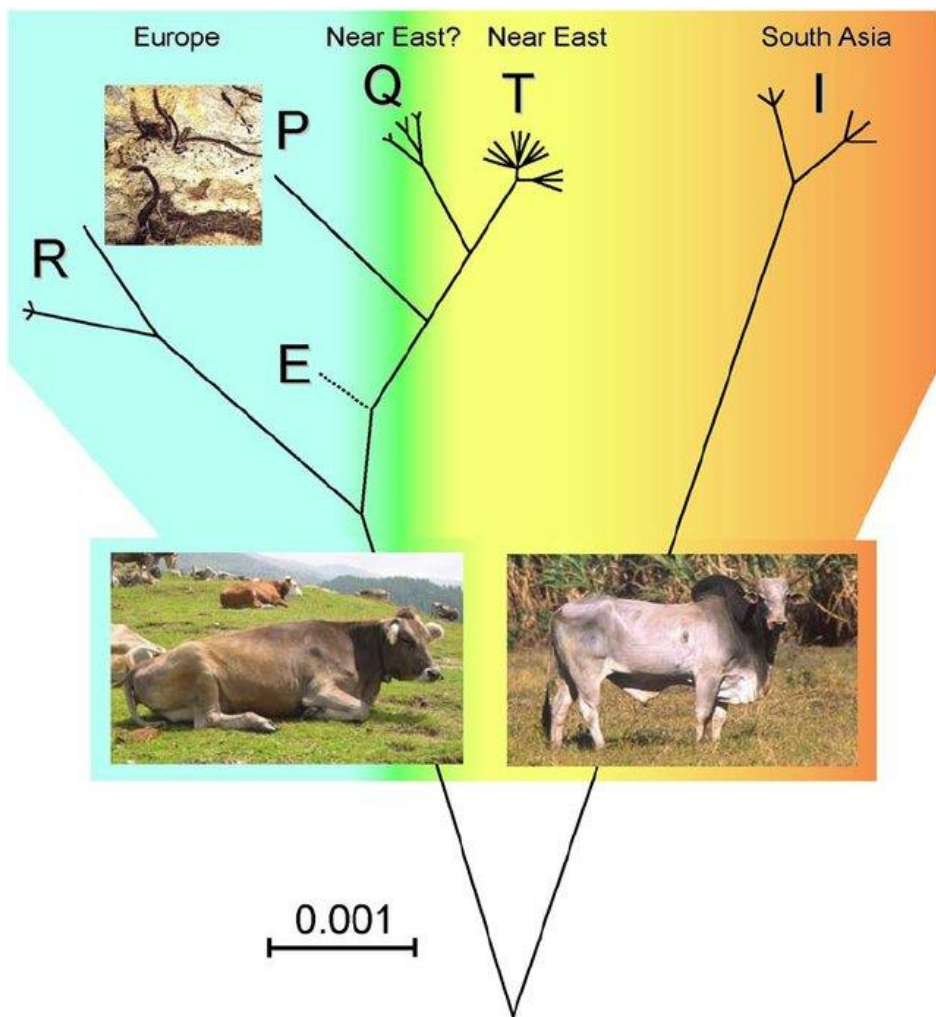


Figura 1.2. Analiza filogenetică a taurinelor pe baza secvențelor de ADNmt (Achilli et al., 2009)

Figure 1.2. Phylogenetic analysis of cattle based on mtDNA sequences (Achilli et al., 2009)

Datele disponibile sugerează că haplogrupurile Q și T au fost implicate în același eveniment neolitic de domesticire din Orientul Apropiat, în timp ce existența haplogrupurilor noi (și rare) evidențiază o moștenire genetică din populațiile distincte de *B. primigenius* (Figura 1.3.).

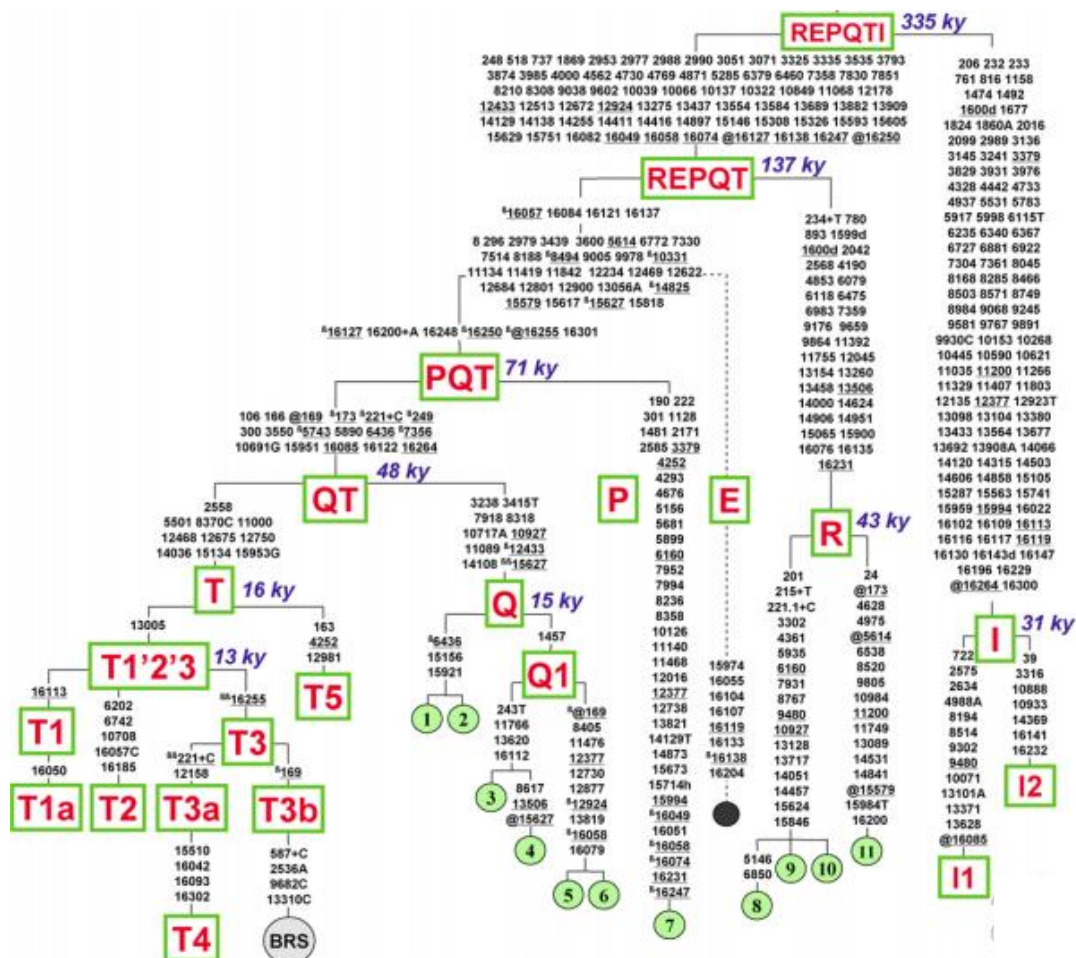


Figura 1.3. Arborele secvențelor complete ale ADNmt la bovine (Achilli, 2009)

Figure 1.3. Tree of complete mtDNA sequences in cattle (Achilli, 2009)

O altă analiză a relațiilor filogenetice dintre bourul sălbatic și respectiv *Bos taurus* (taurine) și *Bos indicus* (zebu), a fost realizată de către Sinding și Gilbert (2016), de unde au rezultat pe baza studiilor mitocondriale, șapte linii, C, E, I, P, Q, R și T (Figura 1.4.). Acest aspect, indică o domesticire a bourului prin cel puțin două evenimente separate: unul din care au rezultat taurinele (*Bos taurus*) cu origine în Orientul Apropiat, și un al doilea eveniment din care a rezultat zebu (*Bos indicus*) cu origine în Asia de Sud (Loftus et al., 1994; Machugh et al., 1997).

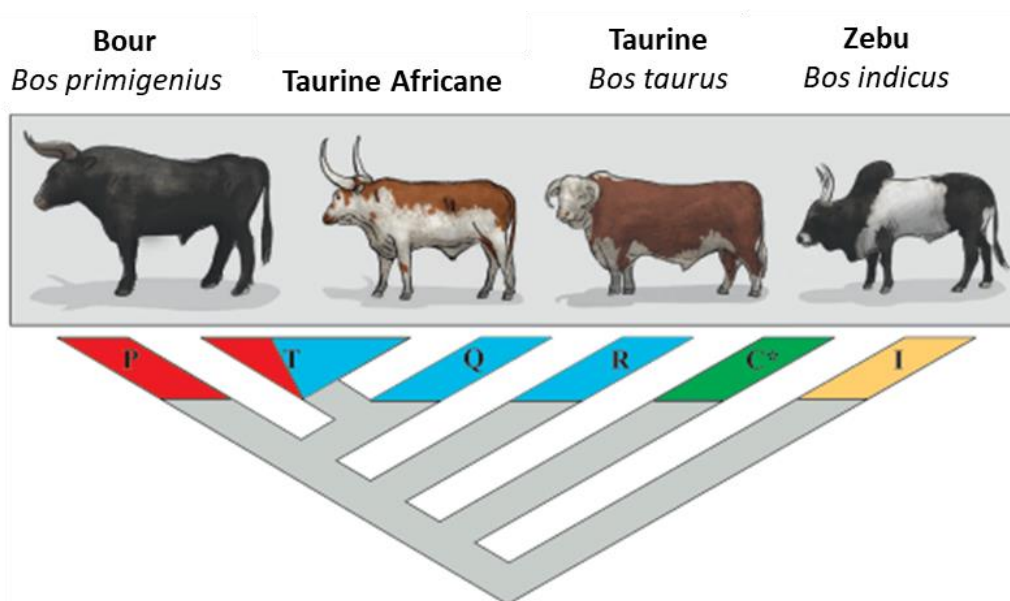


Figura 1.4. Analiza filogenetică între *B. taurus*, *B. indicus* și *B. primigenius* pe baza algoritmului Neighbor – Joining (Sinding, Gilbert, 2016)

Figure 1.4. Phylogenetic analysis between *B. taurus*, *B. indicus* and *B. primigenius* based on the Neighbor - Joining algorithm (Sinding, Gilbert, 2016)

Prin interpretarea datelor mitocondriale în detaliu, se pot observa trei aspecte importante. În primul rând, majoritatea taurinelor moderne se încadrează în linia T, despre care se crede că derivă din primele taurine domesticate în Orientul Apropiat. În al doilea rând, zebu care poartă descendența în linia I. În al treilea rând, toate taurinele rămase în nordul, centrul și estul Europei studiate până în prezent aparțin liniei P care a fost identificată într-un număr mic de rase de taurine europene, domestice, sugerând introgresia taurinelor nordice, centrale și/sau est-europene (Achilli, 2009; Sinding, Gilbert, 2016; Bollongino, 2006; Bollongino, 2008).

De cca. 200 de ani, odată cu apariția conceptului de rasă, situația s-a schimbat dramatic, datorită procesului de selecție (Taberlet et al., 2011; Vigne, 2005), ducând la fragmentarea fondului genetic inițial. Odată cu îmbunătățirea performanțelor de producție a raselor industriale, resursele genetice ale raselor tradiționale, autohtone, s-au diminuat, multe rase de bovine fiind declarate dispărute. Diversitatea genetică atât a bovinelor *Bos taurus*, cât și a celor *Bos indicus* a fost redusă odată cu concentrarea pe rase cu potențial mare de producție (Christopher, 2010).

Majoritatea rudelor sălbatice ale bovinelor, au dispărut deja sau sunt în pericol de dispariție. Pierderea actuală a resurselor genetice se referă nu numai dispariția raselor tradiționale, dar și pierderea diversității genetice în cadrul raselor.

1.2. Diversitatea și sistematica bovinelor

Familia bovinelor (Fam. *Bovidae*) prezintă o mare varietate, fiind descrise peste 300 de specii dispărute sau în pericol de extincție și aproximativ 140 specii existente (Savage, Russell, 1983), sistematica acestora fiind extrem de dificil de realizat, reprezentând unul dintre cele mai mari grupuri de mamifere.

Conform datelor taxonomice, bovinele sunt încadrate astfel:

Regnul: Animalia,
Subregnul: Metazoa,
Încrengătura: Chordata,
Subîncrengătura: Vertebrata,
Clasa: Mammalia,
Subclasa: Eutheria,
Ordinul: Artiodactyla
(Paricopitatae)
Familia: *Bovidae*
Subfamilia: *Bovinae*
Trib: *Bovini*

Încă din cele mai îndepărtate timpuri, bovinele reprezintă cea mai importantă specie economică pentru om, fiind printre primele animale domesticate, în jurul anului 9000 î.Hr. (Loftus, 1994; Clutton-Brock, 1999). Datorită importanței sale ca sursă principală de hrană (lapte și carne), vaca a fost primul mamifer a cărui genom a fost secvențiat complet (Elsik et al., 2009; Dekel, 2015).

Progresele realizate cu privire la tehnicile de secvențiere ale genomului au simplificat într-o oarecare măsură sistematica moleculară a familiei *Bovidae*. Atât analiza genomului complet cât și a regiunilor mitocondriale reprezentate de gena citocromul b (Cyt-b) și D-loop (regiunea de control mitocondrial), a dobândit un interes larg în analiza filogenetică a diferiților taxoni (Miyamoto et al., 1989; Gatesy et al., 1992; Ibrahim et al., 2012).

De-a lungul timpului, au existat numeroase controverse cu privire la componența familiei *Bovidae*, care, conform unor autori (Bibi, 2013; Arif et al., 2012) este formată la rândul ei din două mari subfamilii, *Bovinae* și *Antilopinae*. Pe baza clasificărilor din literatură, aceste subfamilii sunt, de origine eurasiatică și respectiv africană (Matthee, Davis, 2001; Susanne, 2016).

Conform studiilor realizate de Feldhamer et al. (2007); Gentry (2011), pe baza analizelor filogenetice, familia *Bovidae* este formată din 8 subfamilii distincte, aparținând ordinului *Artiodactyla*. (Figura 1.4. A și B).

Aceeași ipoteză este susținută și de către Hernandez Fernandez M. și Vrba Elisabeth (2005) care au elaborat, în cadrul unei cercetări cu privire la sistematica familiei *Bovidae*, un arbore filogenetic ce cuprinde cele 8 subfamilii (Figura 1.5. B.)

Secvența promotorului P1 a TP53 a fost determinată experimental prin amplificare PCR, electroforeză pe gel de agaroză și secvențiere ulterioară. Analiza acestui fragment a relevat un produs cu 272 pb mai lung decât cel întâlnit la specia *Bovinae*, la toate triburile de *Antilopinae*. Segmentul suplimentar de 272 pb, care este situat la aproximativ 500 pb în amonte de TP53 TSS, nu este indicat în genomul oilor, spre deosebire de genomul caprei și al antilopei tibetane (*Pantholops hodgsonii* - specie aparținând tribului *Pantholopini*), unde este întâlnit în aceeași locație din promotorul TP53 P1 (Figura 1.5. A.).

Dekel et al. (2015) au analizat promotorul TP53 P1 a trei specii din subfamilia *Bovinae*: una aparținând tribului *Tragelaphini* (elandul comun din antilopele cu corn spiralat - *Taurotragus oryx*) și două aparținând tribului *Bovini* (bivol de apă - *Bubalus bubalis* și zebu - *Bos indicus*). În cazul speciilor zebu și bivol, similar cu specia *Bovinae*, nu s-a găsit segmentul lung suplimentar, de 272 pb, în timp ce la elandul comun s-a identificat acest segment, cu o lungime de 522 pb. Examinarea aceleiași regiuni promotor în cazul a două familii apropiate de *bovidae*, *Cervidae* (reprezentate de cerbul roșu - *Cervus elaphus* și cerbul pătrat - *Axis axis*) și *Giraffidae* (reprezentată de girafă - *Giraffa camelopardalis*), nu au relevat nicio inserție, similar cu specia *Bovinae* (Figura 1.5. A.).

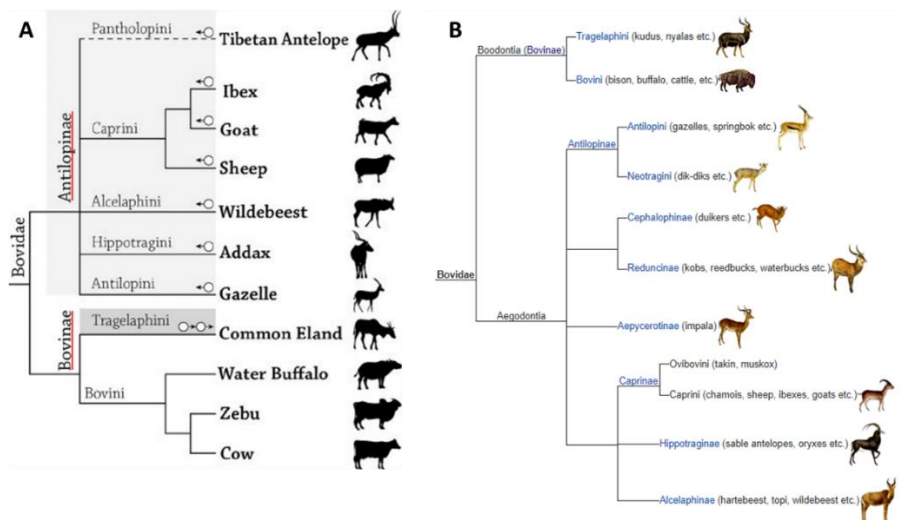


Figura 1.5. A. Arbore filogenetic reprezentând 11 specii: două subfamilii și șapte triburi aparținând familiei *Bovidae* și respectiv două familii de rumegătoare folosite ca out-grupuri (girafă și căprioară)

B. Sistematica familiei *Bovidae* (Dekel et al., 2015; Hernandez-Fernandez, Vrba, 2005)

Figure 1.4. A. Phylogenetic tree representing 11 species: two subfamilies and seven tribes belonging to the *Bovidae* family and two ruminant families used as out-groups (giraffe and deer)

B. Systematics of the *Bovidae* family (Dekel et al., 2015; Hernandez-Fernandez, Vrba, 2005)

Subfamilia *Bovinae* este originară din Africa, America de Nord, Eurasia și subcontinentul Indian și cuprinde un număr de 24 specii din 8 genuri diferite (antilope, taurine sălbatice, bizoni, bivoli asiatici sau africani, etc) (Gentry, 2011; Feldhamer, 2007).

Antilopinae este o altă subfamilie din familia *Bovidae* care se întâlnește cu precădere în estul Africii și include antilope, gazele sau alte specii înrudite cu acestea (Vrba, Schaller, 2000; Estes, 1991).

O altă subfamilie este *Cephalophinae* care cuprinde antilopele de pădure, răspândite în zona Africii Subsahariene și este la rândul ei clasificată în 3 genuri (*Cephalophus*, *Philantomba* și *Sylvicapra*) și 18 specii (Wilson, Reeder, 2005).

Din familia *Bovidae* face parte și subfamilia *Reduncinae* (Wilson, Reeder, 2005; Cotterill, 2005; D'Andrea, 2011), respectiv mamifere artiodactilice numite și *capre de apă*.

Aepycerotinae include doar o singură specie și anume imapala care se întâlnește în Africa (Kingdon, 1989).

Subfamilia *Caprinae* este alcătuită din două mari genuri: *Ovis* și *Capra*; care la rândul lor includ un număr de cca. 35 specii., arealul geografic de răspândire fiind reprezentat de Europa, America, Africa și Asia (Wilson, Reeder, 2005).

Alcelaphinae este subfamilia care are în subordinea sa 10 specii, grupate la rândul lor în patru genuri. Toate cele 10 specii din această subfamilie sunt originare din Africa (Gentry, 2011).

Ultima subfamilie, conform arborelui de mai sus, este *Hippotraginae*, reprezentată de antilopele mari. Această subfamilie include trei genuri: *Hippotragus*, *Oryx* și *Addax* și opt specii. Habitatul lor este reprezentat de zonele Africii și ale Orientului Mijlociu (Harrison, 2011; Demiguel et al., 2012; Bibi, 2013; Geraads et al., 2012).

CAPITOLUL 2

ORIGINEA ȘI FILOGENIA RASELOR DE BOVINE PODOLICE

CHAPTER 2

ORIGIN AND PHYLOGENY OF PODOLIAN CATTLE BREEDS

Numele grupului "*Podolica*" indică o posibilă origine a acestor rase, în Podolia (o regiune din Ucraina) (Beja-Pereira et al., 2006) și răspândirea lor spre sud, până în Anatolia și spre vest până în peninsulele balcanice și italice (Pellecchia et al., 2007; Mariasilvia et al., 2011).

Rezultatele unui studiu realizat de Senczuk și colab. (2021) indică faptul că bovinele podolice prezintă valori mai ridicate ale indicilor diversității genetice decât rasele de taurine africane sau asiatice. Analizele ADN-ului mitocondrial arată că între rasele podolice există relații filogenetice strânse, ceea ce sugerează o ascendență genetică comună (Figura 2.1.) și o istorie evolutivă comună.

Piera Di Lorenzo et al., (2018), au realizat un studiu cu privire la originea raselor de bovine podolice, pe baza analizei ADN-ului mitocondrial. Materialul biologic a fost reprezentat de un număr de 18 rase de bovine podolice (Piemontese-PI, Romagnola-RO, Marchigiana-MR, Chianina-CH, Maremmana-MA, Podolica Italiana/Italian Podolian-IP, Mucco Pisano-MP, Calvana-CA, Bianca di Val Padana-BP, Hungarian Grey-HG, Bulgarian Grey-BG, Istrian cattle-IC, Katerini-KA, Romanian Grey-RG, Slavonian Syrmian Podolian-SS, Turkish Grey-TK, Ukrainian Grey-UK, Podolsko-PO) și 9 rase non-podolice, reprezentând grupul de control (Valdostana-VA, Bruna Italiana-IB, Grigio Alpina-GA, Pezzata Rossa Italiana-RP, Modicana-MO, Reggiana-RE, Agerolese-AG, Cinisara-CI, Cabannina-CB).

În urma studiului, se constată o apropiere genetică între cinci rase de bovine (Chianina, Marchigiana, Maremmana, Podolica Italiana și Romagnola) (Figura 2.2.).

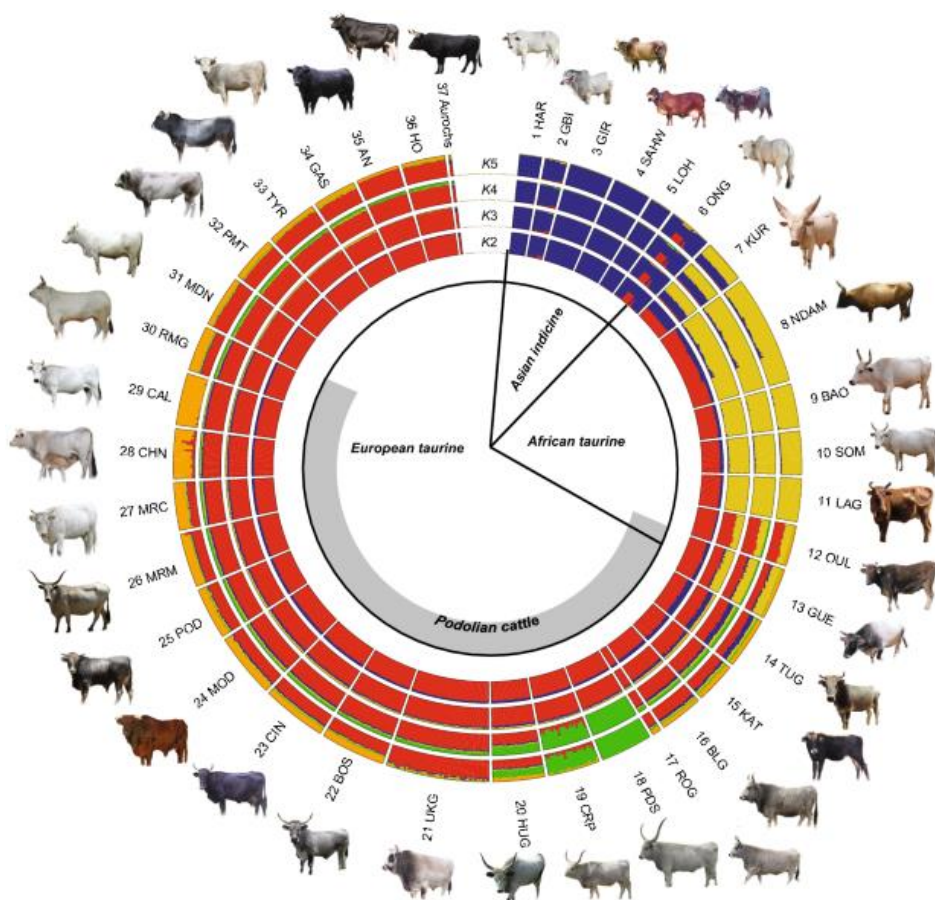


Figura 2.1. Analiza relațiilor filogenetice dintre rasele de bovine podolice și taurinele din zonele Africii și Asiei (Senczuk și colab. (2021))

Figure 2.2. Analysis of the phylogenetic relationships between podolian cattle breeds and african/asian cattle breeds (Senczuk et al. (2021))

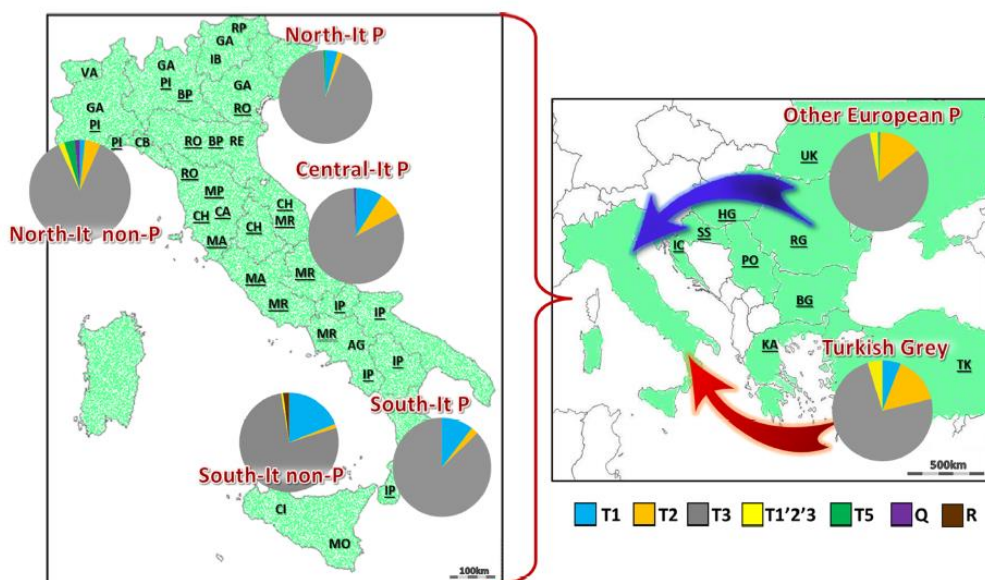


Figura 2.2. Analiza distribuțiilor de frecvență ale haplogrupurilor mitocondriale pentru 18 rase podolice (P, subliniate) și 9 rase non-podolice (non-P) (Piera Di Lorenzo et al., 2018)

Figure 2.2. Analysis of frequency distributions of mitochondrial haplogroups for 18 podolian breeds (P-underlined) and 9 non-podolian breeds (non-P) (Piera Di Lorenzo et al., 2018)

O ipoteză sugestivă ar fi aceea că există o contribuție ancestrală dublă la fondul genetic actual al raselor podolice, care derivă, pe de o parte, de la bovinele din Europa de Est iar pe de altă parte de la bovinele din Orientul Mijlociu (Ramljak, 2011).

În zona Europei de Est se întâlnesc 5 rase de bovine podolice: *Ukrainian Grey*, *Romanian Grey* (*Sura de Stepă*), *Hungarian Grey*, *Slavonian-Syrmian Podolian* și *Serbian* (*Srem*) *Podolian* (Figura 2.3.).

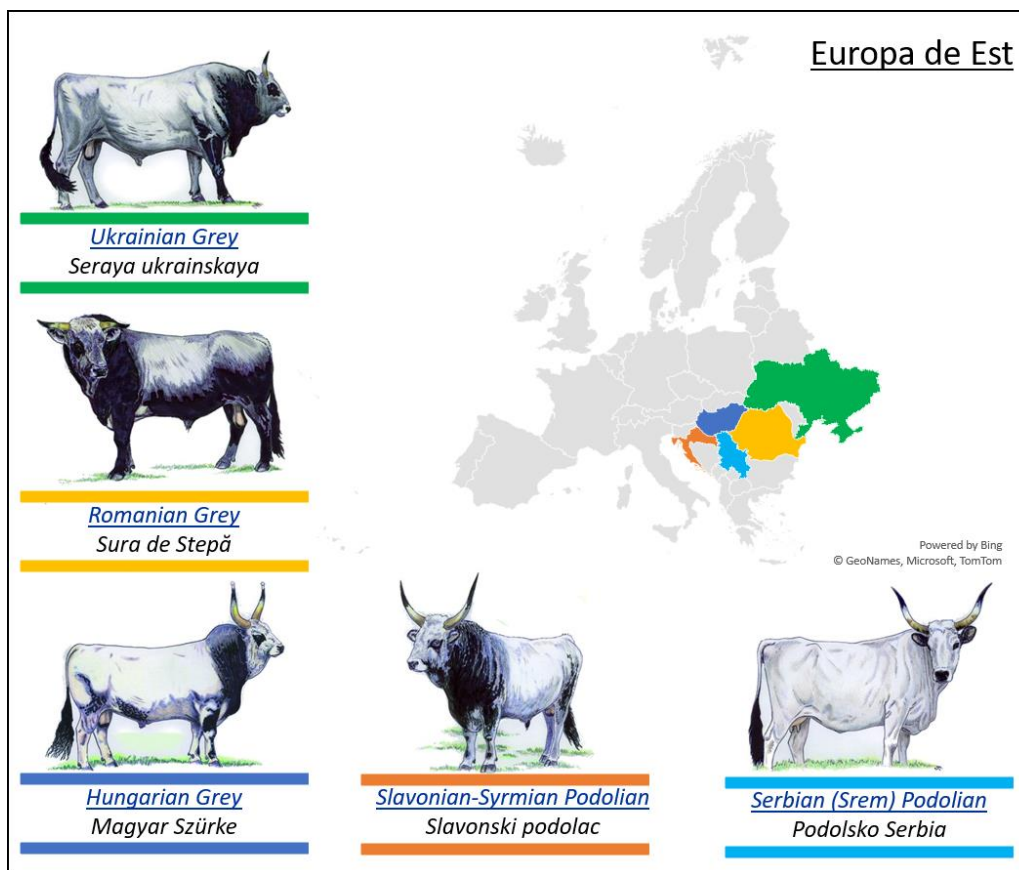


Figura 2.3. Rasele de bovine podolice din zona Europei de Est

Figure 2.3. Podolian cattle breeds from Eastern Europe

În România, ultima rasă locală de bovine este **Sura de Stepă sau Romanian Grey** care are ca strămoș bourul sălbatic, *Bos taurus primigenius* și este inclusă în grupul raselor de bovine podolice alături de alte rase din diverse țări europene (Ukrainian Grey, Hungarian Grey, Italian Grey, Yugoslavian Grey Steppe, Greek Grey Steppe, etc) (Georgescu et al., 2008). Această rasă s-a format de-a lungul a multor secole, sub influența exclusivă a condițiilor naturale de mediu. Numărul indivizilor din țara noastră a fost predominant până la mijlocul secolului al XIX-lea, dar începând cu secolul XX s-a înregistrat un declin tot mai accentuat. A fost răspândită în patru zone geografice ale țării, sub forma a patru varietăți denumite după arealul de formare, respectiv varietățile *Moldovenească, Ialomițeană, Transilvăneană și Dobrogeană* (Creangă et al., 2008; 2013). Conform rapoartelor F.A.O. cu privire la statusul de risc al rasei, Sura de Stepă se află în pericol de extincție-în conservare, încă din anul 2000 (Scherf, 2000).

Rasa de bovine **Ukrainian Grey** este una dintre cele mai vechi rase native, aflată în prezent, în pericol de extincție. Este reprezentativă pentru taurinele autohtone, locale, având origini în *Bos taurus primigenius*. Evoluția acestei rase se caracterizează prin lipsă de încrucișare de mai multe secole, ceea ce asigură existența unui material genetic valoros,

o capacitate exclusivă de rezistență și îngrășare, dar performanțe reduse în ceea ce privește producția de lapte, reprezentând totodată, un instrument interesant al cercetării. Aceste animale s-au dovedit a fi indispensabile țăranilor și au reprezentat cea mai numeroasă rasă din Ucraina până în secolul al XX-lea, fiind distribuită pe scară largă în partea de sud a Europei și zona de stepă a coastei Mediteraneene și a Mării Negre. Procesul de înlocuire a vitelor gri ucrainene cu rase productive a luat amploare în prima parte a secolului al XIX-lea iar treptat s-a ajuns la înlocuirea bourului cu calul și în consecință, populația de bovine a scăzut brusc (Stolpovski, 1998; Kushniraand, Glazko, 2009).

Hungarian Grey este o rasă de bovine indigene, reprezentând un simbol național al Ungariei. Există mai multe teorii cu privire la originea acestei rase, una dintre ele fiind aceea că a ajuns în bazinul Panonnic, unde a avut loc și domesticirea, odată cu imigrația maghiarilor în secolul al IX-lea, în timpul domniei Regelui Árpád, având descendență în bourul sălbatic (*Bos Primigenius*) (Bartosiewicz, 1996; Holló, 2012). Primul document scris care se referă la vitele cenușii maghiare, se intitulează „*magnus cornuotes boves Hungaricos*” și datează din secolul al XVI-lea. Există dovezi scrise cu privire la exportul bovinelor din această rasă, spre zone din vest (Germania, Italia, Moravia) încă din secolul al XIV-lea. Rasa a fost crescută în mod deosebit pentru calitatea excepțională a cărnii. După Primul Război Mondial, când Ungaria a pierdut aproximativ 72% din teritoriul său, până în 1925, au existat aproximativ 321 000 de exemplare din rasa *Hungarian Grey* (Bartosiewicz, 1996; Zsolnai et al., 2020). În prezent, efectivul de bovine din această rasă se confruntă cu un declin numeric accentuat.

Slavonian - Syrmian Podolian este o rasă autohtonă de bovine răspândită în Slavonia, o regiune din partea de nord-est a Croației. Datorită forței fizice și a rezistenței lor, vitele podoliene au fost de neînlocuit în activitățile agricole. În regiunile Podravina, Slavonia și Syrmia, această rasă a fost predominantă până în prima jumătate a secolului al XX-lea, reprezentând 90% din populația totală de bovine (Poljak, 2002; Caput, 2004; Tomislav, 2015). Din anul 1998, rasa este inclusă într-un program național de conservare genetică iar din anul 2000, conform F.A.O. este în pericol de extincție, alături de alte rase de bovine podolice.

Rasa **Serbian (Srem) Podolian** a fost înlocuită treptat în Serbia, ca urmare a importului masiv de bovine specializate pentru producția de carne/lapte. La începutul secolului al XX-lea, rasele autohtone de bovine, au reprezentat 83% din numărul total (Petrovic, 2002; Bogdanovic, 2005). Au fost identificate două varietăți din cadrul raselor autohtone de bovine din Serbia respectiv, *Busha* și *Podolian* (Bogdanovic, 2005), aflate la momentul actual în pericol de extincție.

În zone din Italia și Istria, s-au remarcat de-a lungul timpului 5 rase de bovine podolice: *Istrian cattle (Boškarin)*, *Mursi*, *Istarsko (Istarsko govedo)*, *Maremmiana* și *Podolica* (Figura 2.4.).

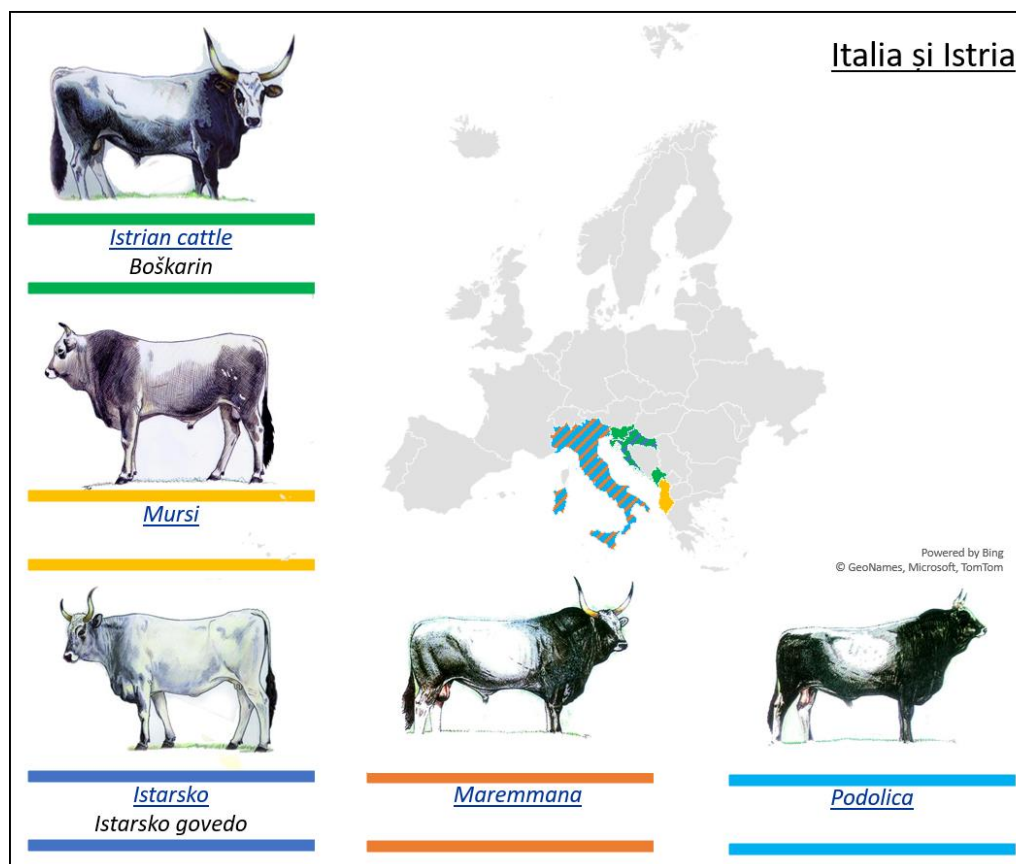


Figura 2.4. Rasele de bovine podolice din zonele Italia și Istria
Figure 2.4. Podolian cattle breeds from Italy and Istria

Bovinele autohtone, numite și **Boškarin** sau **Istrian cattle**, sunt răspândite în special în peninsula Istria. Rasa aparține grupului de bovine podolice, întâlnite în Balcani și țările vecine (Croația, Bulgaria, Grecia, Ungaria, Italia, România, Serbia, Turcia și Ucraina), având descendență directă în *Auroch* (*Bos primigenius*) (Curik, 2014). În ultimii cca. 50 de ani numărul de bovine din Istria a scăzut dramatic. Nivelul consangvinizării și dimensiunea efectivă a populației (N_e) sunt printre cei mai importanți parametri genetici luați în calcul în programele de conservare. La fel ca și în cazul rasei Sură de Stepă din România, rasa Boškarin se află în pericol de extincție-în conservare.

Rasa de bovine **Mursi**, este răspândită în zona South Omo, sud-vestul Etiopiei (Terefe, 2015). Sunt animale mari în raport cu membrii grupului Abyssinian din care fac parte. Majoritatea au coarne mari, de obicei curbate spre interior, cocoasă proeminentă și corp bine dezvoltat. Prezintă o combinație de culori: gri, alb, negru, castaniu, cu pete sau dungă. Bovinele din rasa **Mursi** sunt păstrate în principal pentru producția mare de lapte, dar au o conformație bună și pentru producția de carne (Rege, Tawah, 1999).

Istarsko govedo este o rasă de bovine autohtonă, crescută pentru producția de carne de calitate superioară. În prezent se află pe cale de dispariție, dimensiunea numerică a populației scăzând brusc încă din a doua jumătate a secolului XX. Programul de conservare al acestei rase, a fost lansat abia la începutul anilor 1990 (Ivanković, 2010).

Rasele de bovine din Italia, ***Maremmiana*** și ***Podolica*** erau foarte populare și răspândite în această zonă înainte de cel de-al doilea război mondial dar au înregistrat o reducere consistentă a numărului lor datorită a trei factori majori: mecanizarea în agricultură, urbanizare și concurența raselor cu randament ridicat de producție. Numărul lor de 288.000 și respectiv 630.000 capete (Rognoni, Pagnacco 1983; Moioli, 2004), au fost reduse cu 90% și respectiv, 80% (Scherf, 2000). Cele două rase aparțin grupului de bovine cenușii, a căror origine ancestrală este *B. primigenius*. Ambele rase sunt testate oficial și selectate pentru îmbunătățirea caracteristicilor de creștere și a producției de carne, cu toate acestea, se crede că selecția nu a modificat structura genetică a niciuneia dintre ele (Guarcini, 2009; O'Neill, 2010).

În regiunile Balcani și Anatolia au fost răspândite de-a lungul timpului patru rase de bovine podolice, respectiv: *Bulgarian Grey (Iskar)*, *Katerini cattle*, *Sykia cattle* și *Anatolian Grey (Boz Irk)* (Figura 2.5.).

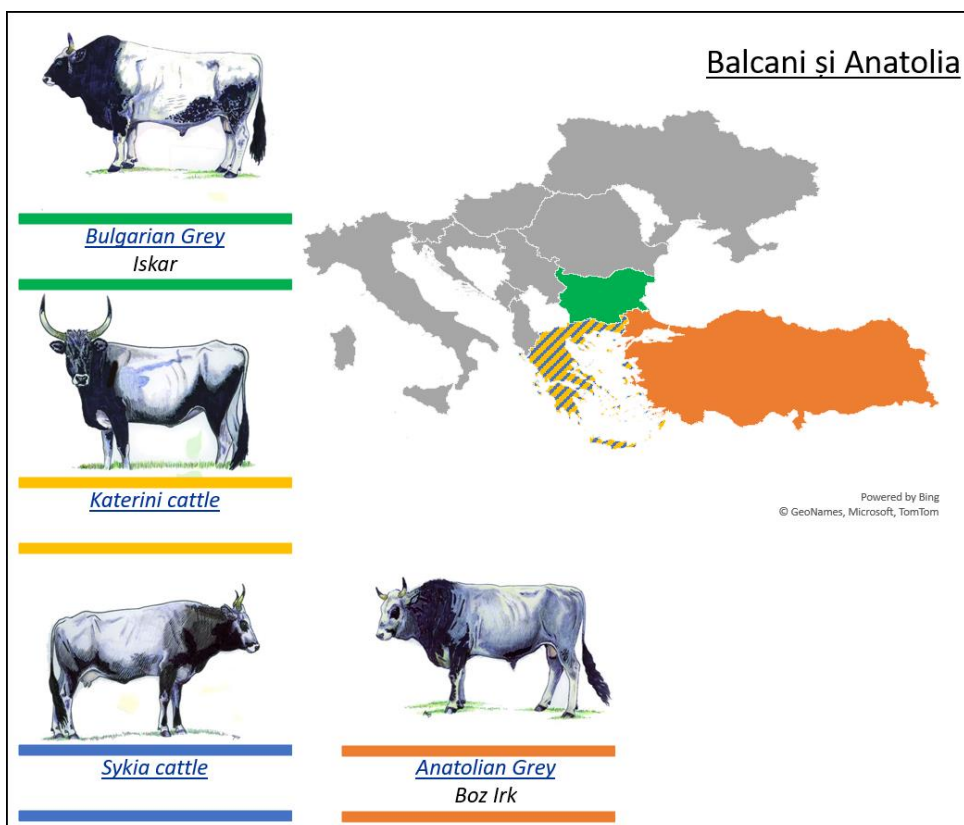


Figura 2.5. Rasele de bovine podolice din regiunile Balcani și Anatolia
Figure 2.5. Podolian cattle breeds in the Balkans and Anatolia

Conform studiilor în domeniul filogeniei bovinelor, pe baza analizelor craniologice, rasa *Bulgarian Grey (Iskar)* este rezultatul încrucișării dintre *Bos taurus brachyceros* și *Bos taurus primigenius*. Rasa se caracterizează prin vitalitate și fertilitate mare, ușurință la fătare, rezistență la boli parazitare și infecțioase și cerințe reduse pentru hrană. În zilele noastre, există mai puțin de 1000 de reprezentanți tipici ai acestei rase. Vitele sunt răspândite în principal în regiunile Plovdiv, Haskovo și Shumen și în regiunile montane Strandzha și Sakar. *Bulgarian Grey* este prima rasă de bovine native, inclusă în Programul Național de conservare a resurselor genetice de origine animală (Kenneth, 1971; Gelev, 2004; Neov, 2013), reprezentând o rezervă genetică valoroasă pentru Bulgaria.

Katerini cattle este o rasă de bovine, crescută în mod principal pentru producția de carne cu calități senzoriale deosebite, în diferite zone geografice ale Greciei. Similar cu celelalte rase de bovine podolice, are descendență directă în *Bos taurus primigenius* (Karatosidi, 2012). Din rapoartele emise de F.A.O. cu privire la statusul de risc al acestei rase, rezultă faptul că prezintă un risc critic, dimensiunea efectivă a populației înregistrând o scădere treptată.

Sykia cattle este o altă rasă veche de bovine, întâlnită în Grecia, în prezent pe cale de dispariție, în principal datorită încrucișărilor aleatorii (Vainas, 1992; Soysal, 2008). Din datele actuale rezultă că ar exista mai puțin de 200 de femele de rasă pură, F.A.O. încadrând rasa în clasa de risc critic în ceea ce privește dimensiunea numerică a efectivului (Scherf, 2000).

Anatolian Grey este o populație de bovine răspândită în Turcia. Statusul acestei rase native, anatoliene este critic, datorită localizării în apropierea primului centru de domesticire (Bruford și Townsend, 2004). Pentru a proteja aceste resurse genetice, a fost inițiat un proiect național în Turcia, având ca obiectiv principal conservarea in vitro și identificarea resurselor genetice valoroase ale bovinelor native (Kurar, 2014; Öner, 2019), având ca rezultat creșterea numerică a populației din rasa *Anatolian Grey*, prin diferite biotehnologii de reproducere.

Conform unor cercetători, există unele distincții fenotipice care se remarcă la bovinele podolice (Bodo, 2014), cum sunt coarnele lungi întâlnite la rasele *Hungarian Grey*, *Katerini* sau *Slavonian Syrmian*, considerate ca fiind caractere de rasă, însă, cu toate acestea, unele rase locale cum sunt *Podolica Italiana*, *Romanian Grey Steppe*, *Ukrainian Grey*, *Turkish Grey* și alte rase balcanice, nu prezintă neapărat coarnele lungi, dar au păstrat unele caracteristici cum ar fi culoarea gri deschis la vacile adulte (Di Lorenzo, 2018).

Conform Organizației pentru Alimentație și Agricultură (F.A.O.), din grupul raselor de bovine podolice, multe sunt grav amenințate cu dispariția, în diferite țări europene (Ivankovic et al., 2014; Maretto et al., 2012). În cadrul acestui capitol vor fi prezentate informații cu privire la statusul de risc al raselor de bovine podolice din Europa.

2.1. Originea și filogenia rasei de bovine Sură de Stepă, din România

În România, Sura de Stepă reprezintă una din cele mai vechi rase autohtone, formată în condițiile pedoclimatice ale țării, având origine în *Bos taurus primigenius* (așa numitul *bour românesc* care era simbolul marcat pe steagul regiunii Moldovei pe vremea lui Ștefan cel Mare) (Ciupercescu et al., 1982).

Conform cercetărilor elaborate de Cardaș, 1955, până în jurul anului 1850, efectivul de taurine din țara noastră era reprezentat de două rase indigene, respectiv Sura de Stepă și Mocănița. Din anul 1892, odată cu primele importuri de rase aloctone (*Simmental*, *Schwyz*, *Pinzgauer*), rasele locale s-au confruntat cu un declin numeric accentuat. Astfel, în 1935, efectivul din rasa Sură de Stepă a scăzut la aproximativ 57,3% din efectivul total de bovine, iar în 1977 la doar 0,6% (Creangă et al., 2013; Georgescu, 2008).

Rasa Sura de Stepă este inclusă alături de alte rase în *grupul raselor podolice*, întâlnite în diverse țări europene (*Podolica Italiana/Italian Podolian*, *Hungarian Grey*, *Bulgarian Grey*, *Istrian cattle*, *Katerini*, *Turkish Grey*, *Ukrainian Grey* etc.) (Di Lorenzo, 2018; Ilie, 2015; Georgescu, 2008; Maciuc, Radu-Rusu, 2018) (Figura 2.6.).

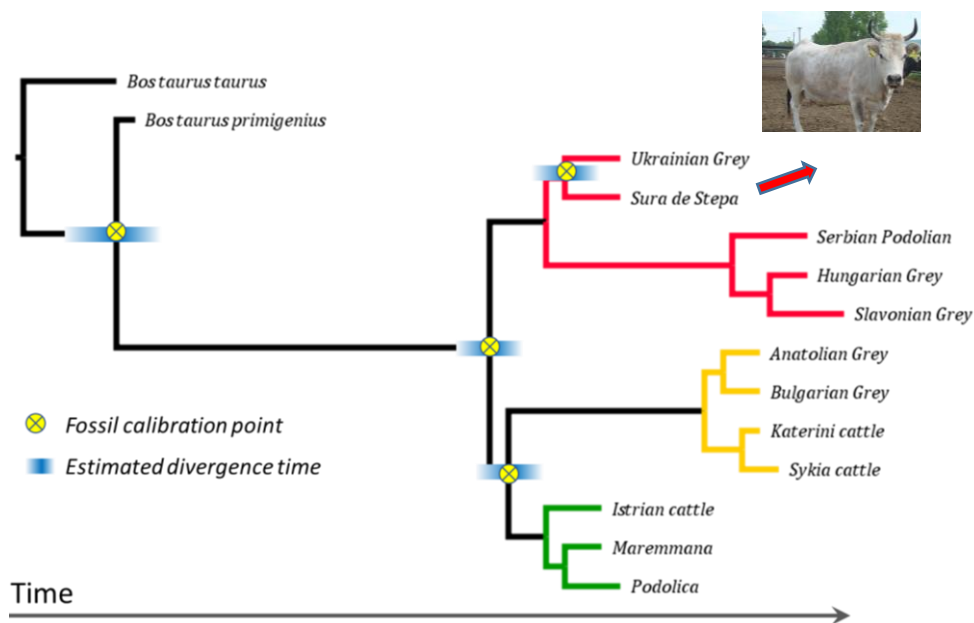


Figura 2.6. Arborele filogenetic al raselor de bovine podolice (Di Lorenzo, 2018)

Figure 2.6. The phylogenetic tree of podolian cattle breeds (Di Lorenzo, 2018)

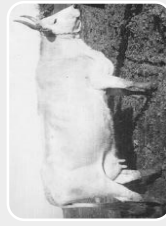
Un aspect important este acela că la formarea și evoluția Surei de Stepă din România a contribuit aproape în exclusivitate mediul natural care i-a imprimat calități aparte de rusticitate, rezistență, adaptabilitate la condițiile de întreținere și modul de hrană (Creangă et al., 2008a; Creangă et al., 2008b).

De-a lungul timpului, în țara noastră, această rasă a cunoscut o largă răspândire, identificându-se sub forma a patru varietăți ecologice (Figura 2.7.), formate sub influența condițiilor climatice variabile (Creangă et al., 2009; Maciuc et al., 2009; Maciuc et al., 2010a; Maciuc et al., 2010b).



VARIETATEA MOLDOVENEASCĂ

- reprezintă tipul caracteristic al Surei de Stepă, cu cea mai mare importanță, fiind răspândită pe întreg arealul geografic al Moldovei. Dezvoltarea corporală este mijlocie iar exteriorul este caracteristic raselor primitive, cu multe defecte în special la membre și uger.



VARIETATEA IALOMITEANĂ

- a rezultat prin încrucișarea vitelor moldovenești cu cele transilvănene, în zona de șes a Dunării, populația rezultată fiind foarte heterogenă și prezentând caractere intermediare între formele brahice și cele primigene. Sunt caracterizate ca având o talie mică, de culoare sură, uniformă, păr abundent pe corp dar producții de lapte și carne slabe.



VARIETATEA TRANSILVĂNEANĂ

- a fost răspândită în teritoriul transilvănean până în jurul anilor 1860-1870. Este varietatea cu cea mai mare dezvoltare corporală. Culoarea corpului este de asemenea, sură-cenușie, cu nuanțe mai deschise la vaci și mai închise la tauri, singurele particularități fiind dezvoltarea mare a coamelor și forma lor caracteristică, cât și aptitudinile de muncă mai bune față de celelalte varietăți.



VARIETATEA DOBROGEANĂ

- prezintă talia cea mai mică și a evoluat sub influența vacilor de munte Isker din Bulgaria, cu care are caracteristici comune. A fost supusă încrucișării de absorbție cu rasele roșii, rezultând populația de taurine *Roșie dobrogeană*, în prezent fiind absorbită de rasa Friză.

Figura 2.7. Descrierea varietăților de Sură de Stepă întâlnite în România (Creangă, Maciuc, 2010)

Figure 2.7. Characterization of *Grey Steppe* varieties found in Romania (Creangă, Maciuc, 2010)

Particularitățile de exterior ale Surei de Stepă din România conduc la distingerea acestei rase de celelalte, prin tipul craniologic și mai exact forma caracteristică a coarnelor care sunt bicolore, albe la bază și cu un punct negru caracteristic. La momentul nașterii, vițeii prezintă o culoare cu nuanțe de galben - roșcat, iar după o perioadă de aproximativ 2-3 luni se schimbă în nuanțe de gri (Maciuc, 2006).

Cu toate că rasa Sură de Stepă face parte din grupul raselor de bovine podolice, există unele diferențe cu privire la caracteristicile morfologice între masculi și femele, în funcție de varietăți și arealul de răspândire (Tabelul 2.1.).

Tabelul 2.1 /Table 2.1

Diferențe morfologice ale diferitelor varietăți din rasa Sură de Stepă
Morphological differences of different varieties of the Gray Steppe cattle breed

Podolian Grey			Greutate medie adult (kg)		Înălțime medie (cm)		Referința
			mascului	femele	masculi	femele	
Iskar Grey (<i>Bulgarian Grey</i>), <i>Sura de stepă din Bulgaria</i>)			750	350	140	118	*
Istrian			900	625	148	138	*
Slavonian Syrmian)	Podolian	(Slavonian	600	460	135	128	*
			600-800 (1000 pentru tauri)	470	135-145	128	**
Katerini			400	285	123	113	*
Sykia			-	-	-	116	*
Hungarian Grey Steppe (Sura de stepă ungurească)			900	600	150	140	*
Iugoslav Steppe			800	500	150	135	*
Sura de stepă românească (<i>varietatea Moldovenească</i>)			780	480	137	129	*
			744	488	-	-	***
Turkish Grey Steppe (Sura de stepă turcească)			470	375.07	126	117.98	****
Ukrainian Grey (Sura de stepă, Ucraina)			780	480	137	129	*

*conform Scherf, 2000; **conform Keros et al., 2015; ***conform Dascălu et al., 2012; ****conform Soysal, Kök, 2008

Rasa Sură de Stepă din țara noastră a reprezentat o proporție numerică predominantă din totalul raselor de bovine, până în mijlocul secolului al XIX-lea, dar începând cu jumătatea secolului XX s-a înregistrat un declin tot mai accentuat (Georgescu et al., 2008; Creangă et al., 2009).

Georgescu împreună cu alți autori (2009), au realizat o cercetare cu privire la diversitatea genetică și originea filogenetică a raselor de bovine predominante în România, punând accent deosebit pe rasa Sură de Stepă. Au fost analizate un număr de cinci rase românești (Bălțată românească, Bălțată cu Negru românească, Brună, Montbeliarde și Sura de Stepă). Astfel, heterozigozitatea calculată pentru rasa Montbeliarde a variat de la 0,580 la 0,690 pentru rasa Brună și de la 0,711 pentru Bălțată

românească la 0,778 pentru Bălțată cu Negru românească. Conform arborelui filogenetic Neighbor joining (NJ) (Figura 2.8.), realizat pentru a pune în evidență relațiile între cele cinci rase, se constată o diferență clară de origine între Sura de Stepă și celelalte patru rase (Romanian Spotted = Bălțată românească; Romanian Black Spotted = Bălțată cu negru românească; Romanian Brown = Bruna; Montbeliarde; Romanian Grey Steppe = Sura de Stepă).

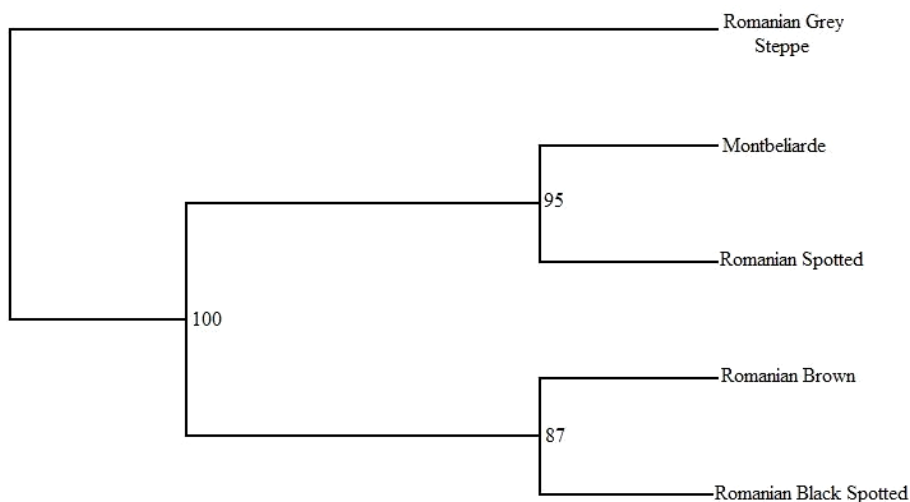


Figura 2.8. Analiza filogenetică a cinci rase de bovine din România (Georgescu et al., 2008)

Figure 2.8. Phylogenetic analysis of five cattle breeds in Romania (Georgescu et al., 2008)

Distanțele genetice rezultate, arată clar faptul că rasa Sură de Stepă este distinctă de celelalte patru populații de bovine, care formează două clustere separate. Sura de Stepă face parte din grupul raselor podolice care își au originea în zona de stepă a Ucrainei de unde au imigrat spre vest și zona Italiei încă din cele mai vechi timpuri (Xuan et al., 2010).

Un alt tip de cercetare s-a concentrat pe studiul markerilor genetici asociați cu caracterele de producție (lapte/carne), mai ales în cazul raselor de bovine amenințate cu dispariția, cum este și cazul Surei de Stepă. Aceste studii au ajutat la aprecierea valorii de conservare a resurselor genetice precum și la stabilirea gradului de uniformitate al rasei (Gradinaru et al., 2018).

În România, studiul polimorfismelor proteinelor majore din lapte (cazeină, lactalbumină și lactoglobulină) au fost realizate de către cercetătorii Bâlțeanu și Ilie Daniela (2007; 2008; 2009; 2010) prin tehnici de focalizare izoelectrică (IEF) și PCR. Rezultatele cercetărilor au condus la identificarea alelei α S1-casein ISM la rasa Sură de Stepă. Această alelă nu a fost raportată la nici o altă rasă europeană de bovine, fiind o alelă ancestrală care provine direct de la strămoșii sălbatici, oferind prima dovadă moleculară a poziției filogenetice a rasei (Bâlțeanu et al., 2007; Bâlțeanu et al., 2008; Bâlțeanu et al., 2010a; Bâlțeanu et al., 2010b; Ilie et al., 2014).

2.2. Originea și filogenia rasei de bovine Pinzgau, din România

Conform cercetărilor din literatura de specialitate, rasele de bovine indigene din România, sunt clasificate în rase primitive și rase ameliorate. Din categoria raselor primitive, autohtone face parte Sura de Stepă iar din categoria celor autohtone, ameliorate fac parte rasele Bălțată Românească, Brună și Pinzgau de Transilvania (Acatincăi, 2004; Acatinăi, 2010; Grădinaru, 2018).

Rasa Pinzgau își are originea în Austria, ținuturile Salzburg, fiind un rezultat al încrucișării taurinelor roșii cu tipul Berna din Elveția, în perioada dintre anii 1690-1740. În a doua jumătate a secolului al XIX-lea, această rasă reprezenta un procent superior în comparație cu celelalte rase din zona Alpilor Austriei de Est și a zonelor învecinate. Ulterior, a fost exportată și în alte areale, respectiv în Peru, Ucraina, centrul Europei, Bulgaria, Ungaria, România, Slovenia, etc (Maciuc, 2006; Šidlová, 2015).

Rasa Pinzgau din România se consideră a fi formată prin încrucișări între vaci din rasa Sură de Stepă și tauri Pinzgauer importați din Austria, în jurul anului 1850 (Angelescu, 1974). Bucovina a reprezentat zona de pornire iar ulterior, prin 1880 s-a răspândit și în partea Munților Apuseni.

Această rasă este crescută ca rasă mixtă, cu scop dublu, atât pentru producția de lapte cât și de carne (Kukučková, 2018).

Evoluția numerică a rasei, arată un procent de ~ 5% din totalul efectivului de bovine al României, în anul 1937, acest procent scăzând până la 1,35%, în 1995 (Maciuc, 2006). Specific rasei Pinzgau este desenul alb, caracteristic ce constituie un caracter de rasă, roba fiind de culoare vișinie cu alb (Davidescu et. al., 2020).

O altă varietate a rasei Pinzgau este așa numita *Vacă de Dorna*, întâlnită în partea de nord a Moldovei și fiind rezultatul încrucișărilor taurinelor locale (Mocănița), cu rase precum Friză, Pinzgau, Simmental sau Brună. O deosebire față de Pinzgaul roșu este culoarea bălțată negru cu desenul alb specific rasei precum și precocitatea mai mare și o rezistență mai crescută la apariția unor boli sau condiții aspre de mediu. De asemenea, talia acestei varietăți este cu ~ 1-2 cm mai mică (Maciuc, 2006; Bocănici, 2007; Davidescu et. al., 2020).

Vitele Pinzgau sunt considerate descendente ale *Bos primigenius*, pe baza morfologiei craniului evidențiindu-se asemănări cu rasele spaniole. Studii asupra craniilor bovinelor au dezvăluit unele brahicefalii, astfel încât această rasă a fost considerată a fi distinctă de alte rase (Brenig, 2020) și aparținând rangului de subspecie *Bos taurus brachycephalicus* (Kiddl și Pirchner, 1971). Mai târziu, Adametz (1926) a sugerat că tendința spre brahicefalie a acestei rase s-a datorat răspândirii unei mutații.

Investigarea probelor de lapte prin tehnica I.E.F., a unor exemplare din rasa Pinzgau, localizate în Austria, Bavaria și Germania de către Erhardt în anul 1996, a dezvăluit o nouă variantă de cazeină (κ -cazeină G) cu o frecvență de 0,003, alelă care nu a fost întâlnită în probele de lapte a altor rase aflate pe cale de dispariție.

Alela A s-a evidențiat la bovinele din rasa Pinzgau într-o combinație unică pentru locii proteinelor din lapte situate pe al 6-lea cromozom (C-A2-BA, care codifică următoarele proteine: α S1-, β -, α S2- și respectiv k-caseină). În cazul proteinelor din zer, β -lactoglobulina este evaluată în cea mai mare parte datorită polimorfismului său, genotipul tip B și BB fiind observate în asociații cu trăsături dezirabile pentru industria laptelui, cum ar fi procentul de grăsime, timpul de coagulare mai scurt și o stabilitate termică mai mare a proteinelor (Barbara Harlizius, 1997; Aleandri et. al., 1990; Ikonen și Ojala, 1995; Kübarsepp et.al., 2005; Caroli et. al., 2010).

O dovadă a introgresiei cu *Bos indicus* este prezența alelei LAA * A, deși limitată, în populația austriacă. Această alelă a fost găsită la toate rasele de zebu, cu frecvențe variabile de la 0,082 la 0,405 (Ibeagha-Awemu et al., 2007).

În cazul rasei Pinzgau austriac, frecvența de 0,2 în cadrul eșantionului de probe analizate de către Caroli și colab. (2010), a haplotipului CSN1S1 * C-CSN2 * A2-CSN3 * A, oferă un alt argument pentru introgresiunea cu *Bos indicus*, după cum sugerează și rapoartele anterioare pe baza altor markeri (Erhardt et. al., 1996; Erhardt et. al., 1997; Erhardt et. al., 1998).

Un studiu elaborat de Czerneková și colab. săi (2006), prezintă diversitatea genetică și relațiile filogenetice între rasa Pinzgau din Slovacia – SPg și alte șase rase de bovine din Europa Centrală, printre care se numără: Czech Pied (CP), Polish Red (PR), Slovakian Pied (SP), Holstein (HO), German Red (GR) și Czech Red (CR), pe baza analizei microsateliților. Arborele filogenetic este reprezentat în figura 2.9.

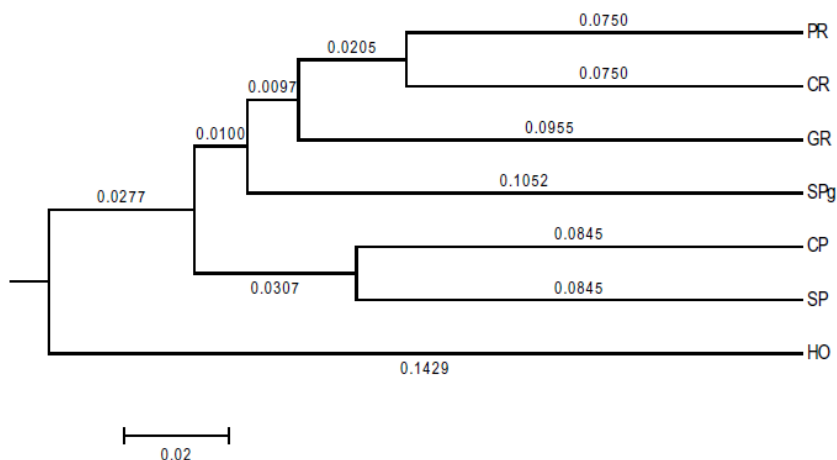


Figura 2.9. Arbore filogenetic construit pe distanțe genetice - Nei, metoda UPGMA (Czerneková et al. 2006)

Figure 2.9. Phylogenetic tree constructed from the genetic distance – Nei, UPGMA method (Czerneková et al. 2006)

Rasa Pinzgau, slovacă prezintă un nivel ridicat de variabilitate genetică în comparație cu celelate șase rase analizate.

Pavlik și colab. (2014), au calculat coeficientul de consangvinizare pentru cinci generații (F5), zece generații (F10) și toate generațiile urmărite, pe baza datelor din pedigree-ul rasei Pinzgau, din Slovacia și Austria. În urma studiului, a rezultat că cea mai mică valoare a coeficientului de consangvinizare a fost de 0,0186 pentru cele 5 generații urmărite (F5), deoarece majoritatea animalelor aveau pedigree-ul destul de complete până la a cincea generație. După cum era de așteptat, consangvinizarea a arătat o tendință în creștere, cu o valoare tot mai mare.

Un alt studiu realizat de Kadlečík și colab. (2011) a arătat un coeficient de consangvinizare mai scăzut (0,0057) pentru populația Pinzgau din Slovacia (Kadlečík et al., 2007; Kadlečík et al., 2011; Kasarda și Kadlečík, 2007 a; Kadlečík et al., 2004; Kasarda, 2019) în timp ce Baumung și Sölkner (2002) au calculat o medie de 0,0209 pentru Pinzgau austriac.

În cazul rasei Pinzgau de Transilvania, Popa și colab., (2013) au calculat coeficientul de consangvinizare pentru un număr de 1917 indivizi și a obținut o valoare de 0,06.

O creștere mai mare a consangvinizării reduce semnificativ diversitatea, provocând probleme serioase pentru menținerea resursele genetice ale unei rase (Židek și Kasarda, 2010; Kasarda et al., 2008; Sidlova, 2014; Kasarda et al., 2007 b).

Evaluarea asemănărilor dintre subpopulațiile austriece și slovace din rasa Pinzgau, pe seama valorii cosinusului unghiului θ dintre vectorii rădăcinilor pătrate ale frecvențelor fondatoare, în cele două populații a fost studiată de către Pavlik (2014). Când această valoare este apropiată de 1, există o similitudine mare între populații, ceea ce indică faptul că populațiile au moștenit contribuții genetice de la aceiași fondatori. În acest caz, valoarea cosinusului unghiului θ a fost de 0,9954, confirmând relația foarte strânsă între cele două subpopulații.

Veronika Kukučková și colab., (2017) a realizat o scanare la nivelul întregului genom al bovinelor Pinzgau din Slovacia pentru a estima diversitatea genetică la un nivel mai detaliat comparativ cu studiile publicate anterior, evaluând totodată, relațiile de filogenie cu alte 15 rase de bovine europene. În urma acestui studiu a rezultat faptul că populația Pinzgau din Slovacia prezintă o variabilitate genetică ridicată (Kukučková, 2016) în comparație cu celelalte 15 rase europene analizate.

Tot cu privire la rasa Pinzgau din Slovacia, Veronika Šidlová și colab. săi a realizat un studiu în anul 2015, pe baza analizei AND-ul genomic extras din materialul seminal recoltat de la un număr de 19 tauri din rasa Pinzgau. Probele de ADN genomic pentru fiecare animal au fost genotipate la un laborator folosind Illumina BovineSNP50 v2 BeadChip, cu o matrice de genotipare de 54.609 SNP-uri. Pentru a înțelege relațiile filogenetice dintre și între rase, alte 103 animale aparținând unui număr de 5 rase de bovine domestice au fost genotipate (Holstein, Simmental, Ayrshire, MRI, Pinzgau slovac și austriac). Rezultatele obținute au demonstrat faptul că taurii din rasa Pinzgau sunt 100% de rasă pură, ceea ce înseamnă că ar putea constitui o bază pentru conservarea rasei prin

utilizarea acestor tauri în schemele actuale de selecție și reproducere (Šidlová, 2014; Šidlová, 2015).

Un număr de 21 tauri de rasă pură Pinzgau din Austria și 19 din Slovacia au fost genotipați cu Illumina bovineHD și bovineSNP50 BeadChip de către Kasarda și colab. (2015). Gradul de diferențiere genetică între taurii austrieci și slovaci, estimat pe baza indicelui F_{ST} a fost scăzut, doar 24% din valorile F_{ST} calculate pentru fiecare SNP au fost mai mari de 0,01, ceea ce înseamnă că taurii din ambele populații aveau strămoși comuni. La toți indivizii analizați s-a observat o heterozigozitate medie de $0,34 \pm 0,01$ (Kasarda, 2015).

Rezultatele studiilor din literatură cu privire la analiza genetică a rasei Pinzgau au indicat importanța populațiilor regăsite în Europa, în programele conservare și în schemele de selecție pentru menținerea statusului activ al rasei (Senczuk, 2020; Baumung și Sölkner, 2002; Sölkner, 2010; Kasarda și Kadlečík, 2011; Šidlová, 2016).

CAPITOLUL 3

STATUSUL DE RISC AL RASELOR DE BOVINE DIN EUROPA

CHAPTER 3

THE RISK STATUS OF EUROPEAN CATTLE BREEDS

Conform *Global Databank for Farm Animal Genetic Resources* (F.A.O., 2000), rasele de bovine sunt clasificate în patru categorii, în funcție de statusul de risc (având la baza dimensiunea populației: masculi/femele): *critic, critic-în conservare, în pericol de extincție și în pericol de extincție-în conservare* (Tabelul 3.1.).

Tabelul 3.1 / Table 3.1

Clasificarea populațiilor de animale după dimensiunea numerică și statusul de risc

(Weigend S. și Romanov M.N., 2002)

Classification of animal species by numerical size and status risk (Weigend S. and Romanov M.N., 2002)

Statusul de risc	Dimensiunea numerică a populației	Nr. masculi	Nr. femele
critic	≤ 120	≤5	≤100
critic-în conservare	"status critic", dar aflat în conservare		
în pericol de extincție		> 5-20	> 100-1000
	> 80 but < 100		femele de rasă pură > 80%
	> 1000-1200		femele de rasă pură < 80%
în pericol de extincție-în conservare	" în pericol de extincție ", dar aflat în conservare		

3.1. Statusul de risc al rasei Sură de Stepă

Rasa de bovine Sură de Stepă se află în pericol de extincție, încă din anul 2000, conform rapoartelor emise de către Organizația Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură (FAO), care atrag atenția asupra declinului numeric al indivizilor din această rasă (Scherf, 2000).

În cazul grupului de bovine podolice (*Podolian Grey*), datele F.A.O. prezentate au arătat un status diferit pentru indivizii răspândiți în toată Europa, variind de la „critic” pentru Sura de Stepă din Bulgaria, Grecia, Germania și Ungaria, până la riscul de extincție pentru populația românească din rasa Sură de Stepă (Tabelul 3.2. și Figura 3.1.).

Tabelul 3.2 / Table 3.2

Distribuția numerică a populațiilor din rasa Sură de Stepă din Europa în acord cu statusul de risc

(Scherf, 2000)

Numerical distribution of European Grey Steppe populations according to status risk (Scherf, 2000)

Podolian Grey	Țara	Date numerice despre populație		Status de risc
		Anul	Nr. de indivizi	
Iskar Grey (Bulgarian Grey)	Bulgaria	1994	245, 120♀, 5♂	critic
Istrian	Croația	1995	110, 103♀, 7♂	critic-în conservare
Slavonian Podolian (Slavonian Syrmian)	Croația	1995	20, 12♀, 3♂	critic-în conservare
Katerini	Grecia	1995	80♀, 5♂	critic
Sykia	Grecia	1995	90♀, 5♂	critic
Hungarian Grey Steppe	Austria	1994	10♀, 4♂	critic-în conservare
	Germania	1997	36♀, 5♂	critic
Sura de Stepă românească (Romanian Grey Steppe)	România	1993	350♀, 12♂	în pericol de extincție-în conservare
Ukrainian Grey	Ucraina	1990	1500, 684♀, 13♂	în pericol de extincție

* ♀ - femele; ♂ - masculi; Global Databank for Farm Animal Genetic Resources (F.A.O., 2000)

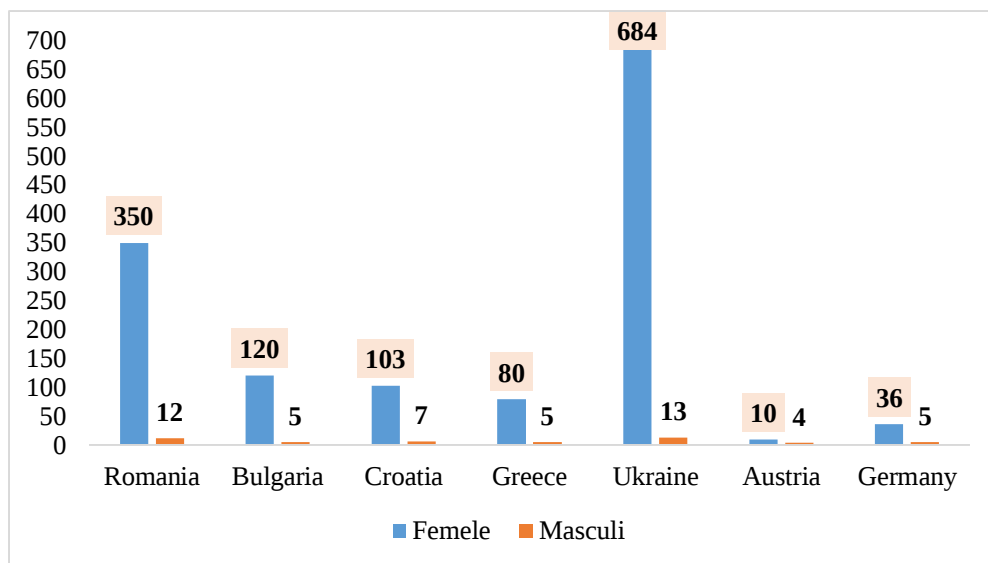


Figura 3.1. Distribuția numerică a populațiilor de bovine din rasa Sură de Stepă (nr. indivizi/țară) (în conformitate cu rapoartele F.A.O., 2000)

Figure 3.1. Numerical distribution of Grey Steppe populations (no. individuals/country) (according to F.A.O. reports, 2000)

Această clasificare a populațiilor din rasa Sură de Stepă din Europa a fost realizată pe baza datelor statistice raportate înainte de anul 2000. În multe cercetări actuale, au fost raportate aproximativ aceleași efective numerice. Acest aspect, însă, nu este valabil pentru

toate populațiile de bovine din rasa Sură de Stepă. Un exemplu elocvent este reprezentat de Sura de Stepă, varietatea ungurească, a cărei efectiv numeric a crescut după anul 1970, ca urmare a unei bune gestionări a resurselor genetice. În Ungaria, această rasă este inclusă atât în programele de conservare cât și în cadrul programelor turistice (Grădinaru et al., 2018; Davidescu et al., 2019).

Dacă până în anul 1982, rasa Sură de Stepă reprezenta o proporție însemnată din totalul raselor de bovine din România, începând cu secolul XX, se constată o scădere bruscă a populației din această rasă, în 1935 scăzând la un procent de aproximativ 57,3% din efectivul total de bovine iar în 1977 la cca. 0,6% (Creangă et al., 2010; Dascălu et al., 2017). Statisticile oficiale prezentate de F.A.O. cu privire la numărul indivizilor din rasa Sură de Stepă, indică faptul că în anul 1986 existau peste 500 de capete iar în 1996 doar 200. În anul 2012, această rasă ocupa locul 8 în topul raselor din România, cu o populație de 83 de capete (0,03%), întâlnite în două mari județe ale Moldovei, respectiv Iași (59 de capete - 0,19%) și Neamț (24 de capete - 0,06%) (Creangă et al., 2013; Creangă et al., 2018; Vidu et al., 2013; Dascălu et al., 2014).

La nivelul anului 2017, conform unui studiu realizat de Dascălu et al., numărul de exemplare din rasa Sură de Stepă a scăzut sub 150 capete. Prin urmare, conform standardelor internaționale, aceasta se află în pericol de extincție. Exemplare izolate din această rasă mai pot fi întâlnite în gospodăriile din nord-estul Moldovei, în județele Iași, Neamț și în Pardina (Delta Dunării).

În prezent, în cadrul Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor, Dancu – Iași (S.C.D.C.B., Dancu – Iași) se derulează un proiect național de conservare genetică a rasei Sură de Stepă, existând un nucleu de 58 animale (37 femele și 21 masculi), reprezentând și materialul biologic al acestei cercetări.

În ciuda productivității sale scăzute, rasa Sură de Stepă reprezintă un fond valoros de gene, datorită caracteristicilor sale de adaptabilitate, rezistență la boli și temperaturi extreme, longevitate etc.

Din anul 2002, s-a emis un registru al rasei și s-au întreprins acțiuni pentru conservarea acesteia, in situ, ultima populație care a supraviețuit fiind reprezentată de nucleul aflat în conservare la Stațiunea de Cercetare – Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor, Dancu-Iași. În ultimii aproximativ 20 de ani, nu se cunosc studii cu privire la statusul de risc al acestei rase aflate în pericol de extincție, folosind instrumente genealogice, cercetări esențiale pentru dezvoltarea unor strategii pe termen lung, capabile să păstreze și să restabilească în mod durabil populațiile de bovine autohtone aflate în pericol de abandon.

În ultima perioadă, Sura românească a fost supusă unui proces neîntrerupt de încrucișare de absorbție cu alte rase (*Simmental*, *Pinzgau*, *Friză*), rezultând astfel rasele ameliorate cum sunt *Bălțată românească*, *Bălțată cu negru românească* *Bruna de Maramureș* sau *Pinzgau de Transilvania* (Creangă et al., 2013; Creangă et al., 2018; Dascălu et al., 2014).

Perspectivile de viitor ar trebui să urmărească conservarea fondului genetic al rasei Sură de Stepă, ca rezervă de gene pentru derularea unor programe de ameliorare fără a modifica însă structura genetică a rasei, astfel încât, caracterele care o definesc să rămână neschimbate. Există o cerință pentru a asigura menținerea structurii genetice în timp. Aceasta se referă la posibilitatea ca taurii și vacile utilizate în reproducere, purtătoare ale unor gene care definesc rasa Sură de Stepă să dea naștere la cel puțin un vițel în prima generație care să moștenească aceste gene valoroase și să le transmită mai departe următoarei generații (Srivastava et al., 2019). Prin urmare, se dorește menținerea liniilor genealogice în conservarea resurselor genetice ale acestei rase.

Având în vedere însușirile deosebite ce definesc rasa Sură de Stepă, perspectivele economice ar trebui să aibă în vedere mai multe direcții de cercetare, punând accent pe rezerva de gene, utilizată în cadrul programelor de ameliorare, încrucișări cu alte rase pentru obținerea unor indivizi cu producții mari de carne.

În contextul actual există o problemă majoră cu privire la prezervarea resurselor genetice, reprezentate de rasele de taurine indigene, unicate, cu importanță cultural-istorică pentru țara noastră.

3.2. Statusul de risc al rasei Pinzgau

Alături de rasa Sură de Stepă, conform rapoartelor Organizației pentru Alimentație și Agricultură (F.A.O.) emise în anul 2000, în categoria raselor amenințate cu riscul de extincție, se încadrează și rasa Pinzgau, în acel moment, înregistrându-se un număr de 1092 femele (Scherf, 2000; Fernández 2003).

În România, cele două rase locale, reprezintă un patrimoniu genetic valoros datorită materialului genetic ce are în structura sa gene de rezistență crescută la îmbolnăviri și capacitate ridicată de adaptare la condiții de mediu severe.

Acestea se află în pericol de dispariție, încă din anul 2000, Organizația F.A.O., sesizând această problemă de interes național prin intermediul rapoartelor emise cu privire la statusul de risc al celor două rase care atrag atenția asupra declinului numeric. De asemenea, aceste rase indigene sunt parte a istoriei țării noastre, așa cum diferitele varietăți ale acestor rase reprezintă același lucru în țările în care s-au format. Metodele aplicate la nivel mondial, în scopul conservării genetice au evoluat considerabil de-a lungul timpului iar rezultatele raportate sunt interesante din punct de vedere al filogeniei și evoluției acestor indivizi (Scherf, 2000).

În cazul rasei Pinzgau, în anul 1944 s-a înregistrat pentru arealul de creștere Bezirk Kitzbühel, Tirol un număr de doar 30 femele și 4 masculi, rasa situându-se în statusul de risc critic. Pe de altă parte, în Germania, bovinele din rasa Pinzgau se află „pe cale de dispariție”, cu 286 de femele înregistrate în registrul genealogic și doar 6 masculi.

Un statut similar a fost raportat și pentru rasa Pinzgau Fleischnutzung, evidențiindu-se 906 femele și 42 masculi înregistrați în registrul genealogic al Germaniei, în anul 1997. În anul 1993, în România, bovinele Pinzgau sau „Pinzgau de Transilvania”,

reprezentau un număr de 1092 femele înregistrate în registrul genealogic (Tabelul 3.3), totodată materialul seminal recoltat de la 23 de tauri era păstrat în vederea menținerii rasei. Cu toate acestea, se raportează tendința de scădere populației din această rasă.

Tabelul 3.3 / Table 3.3

Efectivul populațiilor din rasa Pinzgau la nivel internațional și statusul de risc (Scherf B.D., 2000)
Pinzgau population size and status risk (Scherf B.D., 2000)

Rasa Pinzgau	Țara	Populația înregistrată în registrul genealogic		Status de risc
		Anul	Numărul de animale	
Jochberger Hummeln	<i>Austria</i>	1994	30♀, 4♂	<i>critic-în conservare</i>
Pinzgauer	<i>Germania</i>	1997	286♀, 6♂	<i>în pericol de dispariție</i>
Pinzgauer Fleischnutzung	<i>Germania</i>	1997	906♀, 42♂	<i>în pericol de dispariție</i>
Pinzgau de Transilvania	<i>România</i>	1993	1092♀, 7♂	<i>în pericol de dispariție-în conservare</i>

Rasa Pinzgau este adaptată zonelor montane din România, cu altitudini de peste 1000 m, fiind originară din Austria, Salzburg, Tirol, un areal ce cuprinde zone alpine și subalpine (Antal, 1980).

Rasa s-a format în perioada 1690-1740 prin încrucișarea taurinelor locale roșii cu tipul Berna din Elveția (Maciuc, 2006).

În prezent, interesul fermierilor din întreaga lume este reprezentat de creșterea raselor de bovine specializate pentru producția de lapte sau carne, activitate rentabilă din punct de vedere financiar și care aduce un profit considerabil în rândul marilor întreprinderi. Deși Pinzgau este considerată o rasă autohtonă în România, producțiile sale înregistrate sunt mai mici decât cele ale raselor de bovine specializate pe diferite producții (2000-2500 kg lapte/an cu 3,8% grăsime, cu o greutatea corporală de 400-500 kg în cazul vacilor și 650-700 kg în cazul taurilor) (Drăgănescu, 2006; Matiuti et. al., 2009; Matiuti, 2005; Gîlcă, 2012).

Principalele caracteristici morfologice care subliniază unele diferențe între masculii și femelele aparținând diferitelor varietăți din rasa Pinzgau sunt prezentate în tabelul 3.4.

Tabelul 3.4 / Table 3.4

Diferențe morfologice ale diferitelor varietăți din rasa Pinzgau

Morphological differences of different Pinzgau varieties

Rasa Pinzgau	Greutatea medie a adultului (kg)		Înălțimea medie (cm)		Referința
	masculi	femele	masculi	femele	
Jochberger Hummeln, Germania	1200	700	151	139	*
Pinzgauer, Austria	900	750	143	140	
Pinzgau de Transilvania	900	500	134	127	

* according to Scherf, 2000

Pinzgau de Transilvania atinge o greutate medie a masculilor de până la 900 Kg și o talie de ~ 134 cm, iar în cazul femelelor de până la 500 Kg și 127 cm (Mészáros, 2008; Popa, 2009).

Exemplarele din rasa Pinzgau din Austria, Slovacia și România nu trebuie să își piardă identitatea individuală. Aplicarea unor programe eficiente de conservare ar putea conduce la mărirea efectivului și menținerea resurselor genetice ale acestei rase (Kadlecik, 2004; Melus et. al., 2009).

PARTEA A II-A: CERCETĂRI PROPRII
PART II: THE RESULTS OF OWN RESEARCH

CAPITOLUL 4

DESCRIEREA CADRULUI INSTITUȚIONAL DE DESFĂȘURARE A CERCETĂRILOR

CHAPTER 4

INSTITUTIONAL FRAMEWORK OF RESEARCH

Realizarea obiectivelor propuse în cadrul acestei cercetări a fost posibilă prin efectuarea unor analize în cadrul laboratoarelor specializate atât din țară cât și din străinătate.

Prima etapă a fost recoltarea probelor biologice (sânge) de la populațiile de bovine din rasa Sură de Stepă, aflată în cadrul fermei zootehnice a Stațiunii de Cercetare – Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor, Dancu-Iași și respectiv de la rasa Pinzgau din cadrul Stațiunii de Cercetare – Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor, Târgu-Mureș.

Populația de bovine din rasa Sură de Stepă reprezintă un fond genetic valoros, aflat în prezent în conservare în cadrul S.C.D.C.B., Dancu, cu un număr de 58 exemplare, din care 37 femele și 21 masculi (Figura 4.1.).

În cadrul S.C.D.C.B., Târgu-Mureș existau în anul 2019 un număr de 24 femele de la care au fost recoltate probe biologice în vederea efectuării analizelor de genetică moleculară (Figura 4.2.).



Figura 4.1. Exemplare din cadrul nucleului de bovine din rasa Sură de Stepă, aflat în conservare în cadrul S.C.D.C.B., Dancu-Iași (foto original)

Figure 4.1. Individuals from the Grey Steppe cattle population, in conservation at S.C.D.C.B., Dancu-Iași (original photo)



Figura 4.2. Exemplare din cadrul nucleului de bovine din rasa Pinzgau, aflat în cadrul S.C.D.C.B., Târgu-Mureș (foto original)

Figure 4.2. Individuals from the Pinzgau cattle population, at S.C.D.C.B., Târgu-Mureș (original photo)

În vederea cuantificării diversității genetice a celor două populații de bovine, au fost efectuate o serie de analize în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară al Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași (Figura 4.3.). Aceste analize au implicat: extracția ADN-ului total din probele de sânge recoltate, determinarea purității și concentrației ADN-ului izolat prin spectrofotometrie, amplificarea prin PCR a genei citocrom b și a regiunii de control mitocondrial d-loop, vizualizarea ampliconilor prin tehnica de electroforeză în gel de agaroză și purificarea produșilor PCR prin coloane.



Figura 4.3. Imagini din cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară al Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași (foto original)

Figure 4.3. Images from the Molecular Genetics Laboratory of the Faculty of Biology, "Alexandru Ioan Cuza" University of Iasi (original photo)

Pentru secvențierea markerilor mitocondriali citocrom b și d-loop, probele de ADN au fost purificate și pregătite pentru a fi trimise în cadrul unui laborator specializat din Amsterdam-Olanda, "Macrogen-Europe" (Figura 4.4.) iar secvențele de ADN obținute, au fost trimise în format electronic, sub forma unor fișiere de tip FASTA și a

unor cromatograme specifice fiecărei secvențe analizate, pentru fiecare individ din cadrul celor două rase.



Figura 4.4. Secvențiator din cadrul Laboratorului de secvențiere, MacroGen-Europe, Olanda (dna.macrogen-europe.com)

Figure 4.4. Sequencer from the Sequencing Laboratory, MacroGen-Europe, Netherlands (dna.macrogen-europe.com)

Următoarea etapă a constat în interpretarea statistică și reprezentarea grafică a datelor obținute, prin utilizarea unor programe specifice, de analiză a secvențelor genice.

CAPITOLUL 5
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI, MATERIALUL ȘI
METODOLOGIA CERCETĂRII
CHAPTER 5
AIM OF THE STUDY, BIOLOGICAL MATERIAL AND
METHODOLOGY OF RESEARCH

În cadrul acestei lucrări, s-au efectuat o serie de cercetări pentru a evalua diversitatea genetică a două populații de bovine din rasele Sură de Stepă și Pinzgau din România, prin analiza a doi markeri genetici mitocondriali (citocrom b și d-loop), relevanți pentru studii de diversitate genetică, filogenie, filogeografie moleculară și identificarea relațiilor taxonomice între indivizi din diferite specii.

Cercetarea de față vine în completarea informațiilor existente în literatura de specialitate, cu aspecte privind unele incertitudini taxonomice și evidențierea a noi considerente relative la istoria evolutivă a acestor populații din cadrul subfamiliei *Bovidae*.

5.1. Scopul și obiectivele studiului

Scopul acestei cercetări a fost acela de a cuantifica variabilitatea genetică a populațiilor de bovine locale, din rasele Sură de Stepă și Pinzgau.

Pentru atingerea scopului propus s-a urmărit un plan de obiective, ce a implicat parcurgerea mai multor etape specifice de cercetare:

3. *Cuantificarea variabilității genetice a populațiilor de bovine din cele două rase, prin parcurgerea următoarelor etape:*

➤ identificarea haplotipurilor prezente atât în populația de bovine Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu-Iași cât și a populației din rasa Pinzgau din cadrul S.C.D.C.B, Târgu-Mureș, prin analiza secvențelor nucleotidice ale citocromului b și a regiunii de control mitocondrial d-loop;

➤ estimarea diversității genetice intra și interpopulaționale pe baza rezultatelor obținute în urma analizei celor doi markeri mitocondriali.

4. *Analiza filogenetică a raselor prin parcurgerea următoarelor etape:*

➤ compararea ratei de evoluție a markerilor mitocondriali studiați, cu rata de evoluție a genomului mitocondrial complet, atât la nivel de rasă, specie cât și la nivel de gen, prin analiza secvențelor genice rezultate în urma secvențierii;

➤ impactul celor doi markeri mitocondriali în estimarea timpului de divergență;

➤ reconstrucția filogeografică pentru taxonii grupului țintă.

5.2. Materialul biologic analizat

Analiza relațiilor filogenetice și cuantificarea diversității genetice la rasele de bovine Sură de Stepă și Pinzgau, a fost inițiată prin etapa de recoltare a probelor biologice, respectiv sânge.

Au fost recoltate probe de la un număr de 32 exemplare femele, aparținând nucleului aflat în conservare în cadrul fermei zootehnice S.C.D.C.B., Dancu-Iași și respectiv 24 probe de sânge de la femele din cadrul S.C.D.C.B., Târgu-Mureș.

Analizele moleculare în vederea atingerii obiectivelor propuse au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară al Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași.

Pentru atingerea planului de obiective au fost parcurse o serie de etape de analiză:

- ✓ izolarea și purificarea ADN-ului total din probele de sânge recoltate;
- ✓ cuantificarea ADN-ului total prin tehnica de spectrofotometrie;
- ✓ amplificarea markerilor mitocondriali citocrom b și d-loop prin tehnica PCR;
- ✓ validarea ampliconilor prin electroforeză în gel de agaroză;
- ✓ purificarea ADN-ului;
- ✓ secvențierea genelor de interes;
- ✓ descărcarea secvențelor nucleotidice pentru cele două gene de interes din baza internațională de date GenBank (N.C.B.I.), respectiv pentru genomul mitocondrial complet al genului *Bos taurus*, fiind utilizate ca referințe la secvențele analizate;
- ✓ alinierea secvențelor descărcate și a celor de interes;
- ✓ cuantificarea distribuției demografice și spațiale precum și a fluxului de gene pentru populațiile de bovine analizate, utilizând programe specifice;
- ✓ reconstrucția filogeografică a celor două rase.

În cazul rasei Sură de Stepă, pentru realizarea acestei cercetări au fost recoltate un număr de 32 probe de sânge de la femele (Figura 5.1. A) iar în cazul rasei Pinzgau, au fost recoltate 24 probe, de asemenea de la indivizi de sex feminin (Figura 5.1. B).



Figura 5.1. Materialul biologic de la care au fost recoltate probele (foto original)

A. Sură de Stepă; **B.** Pinzgau

Figure 5.1. Biological material from analysis (original photo)

A. Grey Steppe; **B.** Pinzgau

În tabelele 5.1 și 5.2 se regăsesc informații cu privire la exemplarele de bovine de la care s-au recoltat probele, cu următoarele date de identificare: rasă, cod de identificare sau numărul matricol înscris pe crotalie, data nașterii, vârsta individului (luni), sexul și tipul de material biologic recoltat.

Tabelul 5.1 / Table 5.1

Date de identificare ale indivizilor din rasa Sură de Stepă de la care s-a recoltat material biologic în scopul efectuării analizelor genetice - date preluate din Registrul Genealogic al rasei (S.C.D.C.B. Dancu-Iași, 20.06.2020)

Identification data of the individuals of Grey Steppe cattle breed, biological material for genetic analysis - data taken from the Genealogical Register of the breed (S.C.D.C.B., Dancu-Iași, 20.06.2020)

Nr. crt.	Rasa de bovine	Nr. matricol	Data nașterii	Vârsta (luni)	Sexul	Tipul probei
1.	Sură de Stepă	RO242000109988	07.01.1996	288	F	sânge-ss01
2.	Sură de Stepă	RO242000110002	05.01.2000	242	F	sânge-ss02
3.	Sură de Stepă	RO245000109998	07.01.2001	228	F	sânge-ss03
4.	Sură de Stepă	RO241000109812	09.01.2003	202	F	sânge-ss04
5.	Sură de Stepă	RO247000109811	06.01.2004	193	F	sânge-ss05
6.	Sură de Stepă	RO243000109786	12.01.2004	187	F	sânge-ss06
7.	Sură de Stepă	RO243000109800	01.01.2005	186	F	sânge-ss07
8.	Sură de Stepă	RO242000110205	02.02.2005	185	F	sânge-ss08
9.	Sură de Stepă	RO243000109723	02.02.2005	185	F	sânge-ss09
10.	Sură de Stepă	RO241000110120	03.01.2005	184	F	sânge-ss10
11.	Sură de Stepă	RO241000110274	09.01.2005	178	F	sânge-ss11
12.	Sură de Stepă	RO242000120579	12.01.2005	175	F	sânge-ss12
13.	Sură de Stepă	RO243000120587	12.01.2005	175	F	sânge-ss13
14.	Sură de Stepă	RO242000120656	03.10.2006	171	F	sânge-ss14

Nr. crt.	Rasa de bovine	Nr. matricol	Data nașterii	Vârsta (luni)	Sexul	Tipul probei
15.	Sură de Stepă	RO243000120678	03.10.2006	171	F	sânge-ss15
16.	Sură de Stepă	RO243000174164	10.10.2007	152	F	sânge-ss16
17.	Sură de Stepă	RO242000218328	21.06.2008	144	F	sânge-ss17
18.	Sură de Stepă	RO243000218587	03.03.2009	136	F	sânge-ss18
19.	Sură de Stepă	RO143000108432	10.10.2009	128	F	sânge-ss19
20.	Sură de Stepă	RO248001058693	03.12.2011	111	F	sânge-ss20
21.	Sură de Stepă	RO507000112314	06.01.2011	109	F	sânge-ss21
22.	Sură de Stepă	RO506001166289	06.01.2012	97	F	sânge-ss22
23.	Sură de Stepă	RO504001166308	22.06.2012	96	F	sânge-ss23
24.	Sură de Stepă	RO508003831422	09.08.2014	69	F	sânge-ss24
25.	Sură de Stepă	RO502003831482	27.10.2014	68	F	sânge-ss25
26.	Sură de Stepă	RO504005500784	06.05.2015	61	F	sânge-ss26
27.	Sură de Stepă	RO501007300790	25.03.2017	39	F	sânge-ss28
28.	Sură de Stepă	RO508007300858	06.01.2017	37	F	sânge-ss29
29.	Sură de Stepă	RO507007405358	02.01.2018	29	F	sânge-ss30
30.	Sură de Stepă	RO504007405388	03.01.2018	28	F	sânge-ss31
31.	Sură de Stepă	RO507007448267	23.03.2018	27	F	sânge-ss33
32.	Sură de Stepă	RO500007448406	19.08.2018	22	F	sânge-ss34

Tabelul 5.2 / Table 5.2

Date de identificare ale indivizilor din rasa Pinzgau de la care s-a recoltat material biologic în scopul efectuării analizelor genetice (date preluate din cadrul S.C.D.C.B., Târgu-Mureș, 10.11.2020)

Identification data of the individuals of Pinzgau cattle breed, biological material for genetic analysis (data taken from S.C.D.C.B., Târgu-Mureș, 10.11.2020)

Nr. crt.	Rasa de bovine	Nr. matricol	Data nașterii	Vârsta (luni)	Sexul	Tipul probei
1.	Pinzgau	5757	13.06.2019	16	F	sânge-ss01
2.	Pinzgau	1967	17.11.2013	83	F	sânge-ss02
3.	Pinzgau	4471	14.10.2014	72	F	sânge-ss03
4.	Pinzgau	2713	10.06.2015	65	F	sânge-ss04
5.	Pinzgau	1059	23.10.2015	60	F	sânge-ss05
6.	Pinzgau	1408	26.01.2018	33	F	sânge-ss06
7.	Pinzgau	2035	01.01.2016	58	F	sânge-ss07
8.	Pinzgau	1864	11.07.2015	64	F	sânge-ss08
9.	Pinzgau	0973	19.11.2018	23	F	sânge-ss09
10.	Pinzgau	0992	05.01.2018	34	F	sânge-ss10

Nr. crt.	Rasa de bovine	Nr. matricol	Data nașterii	Vârsta (luni)	Sexul	Tipul probei
11.	Pinzgau	0989	02.01.2018	33	F	sânge-ss11
12.	Pinzgau	0785	30.04.2013	90	F	sânge-ss12
14.	Pinzgau	1942	21.08.2013	86	F	sânge-ss14
15.	Pinzgau	7310	14.11.2013	84	F	sânge-ss15
16.	Pinzgau	6319	02.02.2014	81	F	sânge-ss16
17.	Pinzgau	6260	02.05.2015	66	F	sânge-ss17
18.	Pinzgau	0755	26.04.2015	66	F	sânge-ss18
19.	Pinzgau	4036	24.08.2016	50	F	sânge-ss19
20.	Pinzgau	1863	10.07.2015	63	F	sânge-ss20
21.	Pinzgau	5796	30.10.2019	12	F	sânge-ss21
22.	Pinzgau	7876	16.03.2019	20	F	sânge-ss22
23.	Pinzgau	7885	01.05.2019	18	F	sânge-ss23
24.	Pinzgau	7887	05.05.2019	18	F	sânge-ss24

În cazul rasei de bovine Sură de Stepă, intervalul de vârstă a fost cuprins între 22-288 luni, cu o medie de 134,5 luni în timp ce pentru rasa de bovine Pinzgau media de vârstă a fost de 52 luni, cu limite între 12 respectiv 90 luni (Figura 5.2.)

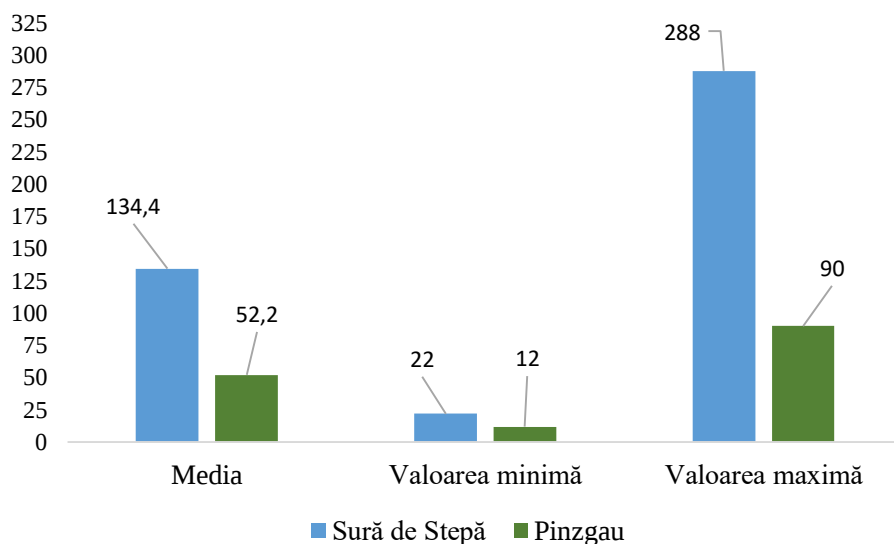


Figura 5.2. Media de vârstă a exemplarelor din rasele de bovine Sură de Stepă și Pinzgau analizate
Figure 5.2. The average age of the individuals from Grey Steppe and Pinzgau cattle breeds analyzed

Din graficele 5.2 respectiv 5.3 (a) și (b) se poate observa faptul că femelele de rasa Sură de Stepă prezintă o vârstă mai înaintată față de cele din rasa Pinzgau, cele din

urmă fiind încă exploatate pentru producții mixte (lapte/carne) în timp ce Sura de Stepă este păstrată doar în vederea menținerii resurselor genetice valoroase pe care această rasă de posedă.

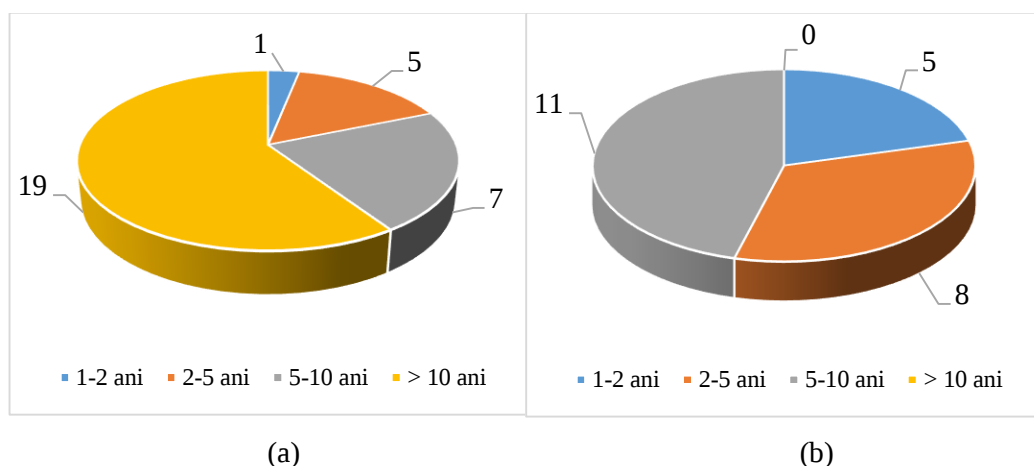


Figura 5.3. Distribuția numerică în funcție de vârstă a exemplarelor din rasele de bovine Sură de Stepă (a) și Pinzgau (b)

Figure 5.3. Numerical distribution by age of Grey Steppe (a) and Pinzgau (b) cattle breeds

Pentru rasa Sură de Stepă, un număr de 19 exemplare din totalul de 32 prezintă o vârstă de peste 10 ani, 7 exemplare se încadrează în limitele 5-10 ani, 5 exemplare în intervalul 2-5 ani și respectiv o singură femelă are o vârstă cuprinsă între 1-2 ani. Pe de altă parte, în cazul rasei Pinzgau, 11 femele dintr-un total de 24 au o vârstă cuprinsă între 5-10 ani, 8 exemplare au ca limite de vârstă 2-5 ani, 5 exemplare se situează în intervalul 1-2 ani. În cazul rasei Pinzgau nu au fost luate în studiu femele cu o vârstă de peste 10 ani.

În concluzie, din analiza grafică a celor două rase de bovine se constată faptul că exemplarele din rasa Sură de Stepă sunt mult mai înaintate ca vârstă în comparație cu cele din rasa Pinzgau.

5.3. Metodologia cercetării

Pentru investigarea materialului genetic la bovine, se parcurg de regulă mai multe etape de lucru care implică:

- extracția ADN-ului genomic total din probele recoltate;
- cuantificarea ADN-ului (determinarea purității și concentrației) prin tehnica de spectrofotometrie;
- amplificarea secvențelor de interes prin tehnica PCR;
- vizualizarea ampliconilor prin electroforeză în gel de agaroză;
- purificarea ADN-ului extras;
- secvențierea genelor de interes;

- descărcarea secvențelor nucleotidice de interes din baza internațională de date GenBank (N.C.B.I.), utilizate ca referințe;
- interpretarea statistică a rezultatelor obținute;
- formularea unor concluzii clare cu privire la îndeplinirea obiectivelor propuse.

5.3.1. Recoltarea probelor biologice

Probele de sânge au fost recoltate prin puncția venei jugulare, utilizându-se tuburi de tip Vacutainer cu EDTA (acid etilendiaminotetraacetic) pentru a preveni coagularea, cu capacitatea de 2 ml și ace de recoltare tip 18 G (Figura 5.4.).



Figura 5.4. Recoltarea probelor de sânge în eprubete cu EDTA (foto original)

Figure 5.4. Collection of blood samples in EDTA tubes (original photo)

În cazul Surei de Stepă, probele au fost numerotate de la SS_01 la SS_34, "SS" fiind prescurtarea de la titulatura rasei - Sură de Stepă. Numerele de ordine SS_27 și SS_32 corespund celor doi tauri existenți în cadrul fermei S.C.D.C.B., Dancu-Iași (conform listei cu datele de identificare ale indivizilor, descărcate din baza de date a rasei), prin urmare au rămas poziții libere, deoarece în acest studiu s-a urmărit cuantificarea diversității genetice doar prin analiza exemplarelor de sex feminin. Probele recoltate de la rasa Pinzgau au fost numerotate de la P_01 la P_24, "P" fiind prescurtarea de la titulatura rasei - Pinzgau.

Înainte de a trece la analiza propriu-zisă a materialului biologic recoltat de la cele două rase de bovine, s-au întocmit *Registrele de recepție a probelor* care cuprind atât date de identificare a femelelor de la care s-a recoltat sângele cât și date referitoare la markerii mitocondriali citocrom și d-loop.

5.3.2. Izolarea și cuantificarea ADN-ului total din probele de sânge

a. Izolarea ADN-ului total din probele de sânge

În cazul de față, izolarea ADN-ului din probele de sânge s-a realizat prin metoda automatizată, cu echipamentul *Maxwell™ 16 and 16 MDx instruments*, folosind un kit special, furnizat de distribuitorul Promega: 48 Maxwell™ 16 MCD LEV, care conține 50 de pistonii de purificare LEV, 50 de tuburi de eluție, 20 ml tampon de liză, două soluții de 1 ml proteinază K și 20 ml tampon de eluție.

Acest echipament poate procesa până la 16 probe în 40 de minute, ADN-ul extras putând fi utilizat într-o varietate de aplicații, inclusiv PCR și electroforeză pe gel de agaroză.

Protocolul de extracție a ADN-ului cuprinde mai mulți pași:

1. Omogenizarea probelor de sânge timp de cel puțin 5 minute, la temperatura camerei.
2. Pregătirea și etichetarea tuburilor de incubare care trebuie să fie compatibile cu blocul de încălzire al echipamentului de extracție.
3. Adăugarea unui volum de 30 μ l soluție proteinază K (PK) în fiecare tub de incubare.
4. Adăugarea probelor (până la un volum de 300 μ l) în tuburile de incubare.
5. Adăugarea unui volum de 300 μ l tampon de liză în fiecare tub de incubare.
6. Vortexarea tuburilor timp de 10 secunde.
7. Incubarea tuburilor în blocul de încălzire (setat la 56°C), 20 de minute, timp în care se pregătesc cartușele.
8. Transferul probelor de lizat de sânge, din tubul de incubare în cartușe.

Pregătirea cartușelor: Se așează fiecare cartuș în rack și se fixează în poziția corespunzătoare. Se îndepărtează cu atenție sigiliul, astfel încât tot plasticul să se desprindă din partea superioară a cartușului.

Înainte de toate, se asigură ca benzile de etanșare și orice adeziv rezidual de pe cartușe să fie îndepărtate (Figura 5.5.).



Figura 5.5. Pregătirea cartuşelor pentru extracţia ADN-ului cu echipamentul Maxwell 16 LEV Blood DNA kit (Sursa: protocol de extracţia ADN: Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit)

Figure 5.5. Preparation of cartridges for DNA extraction with the Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit (Source: DNA extraction protocol: Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit)

După introducerea cartuşelor şi a celorlalte consumabile se porneşte echipamentul, se selectează "DNA" din meniu, apoi "Blood Method" şi în final, opţiunea "Run program" . Programul va începe să ruleze automat, având loc extracţia ADN-ului din cele 16 probe în aproximativ 40 minute (Figura 5.6.).

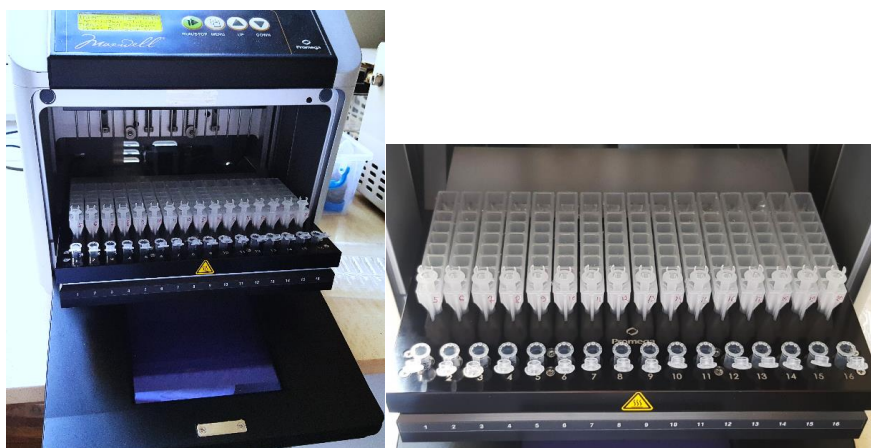


Figura 5.6. Pregătirea probelor şi a echipamentului Maxwell 16 LEV pentru extracţia ADN-ului genomic total (foto original)

Figure 5.6. Preparation of samples and Maxwell 16 LEV equipment for total genomic DNA extraction (original photo)

Metoda prezintă o serie de avantaje, printre care se numără precizie cantitativă, acurateţe, rapiditate, grad ridicat de automatizare şi obţinerea unor probe de ADN de concentraţie şi puritate bună.

b. Cuantificarea ADN-ului prin tehnica de spectrofotometrie

Cantitatea de ADN total a fost cuantificată cu ajutorul spectrofotometrului de tip Nanodrop ASP-3700 (ACTGene Inc., USA) (Figura 5.7.). Această metodă spectrofotometrică are la bază următorul principiu: majoritatea substanțelor de natură biologică prezintă o rată de absorbție caracteristică în domeniul radiațiilor ultraviolete (UV). Astfel, rata de absorbție de 260 nm corespunde acizilor nucleici ADN/ARN, cea de 280 nm proteinelor iar cea de 230 nm diferiților contaminanți (Cojocaru et al., 2004).

În acest studiu, densitatea optică a fost măsurată la rata de absorbție A260 nm și A280 nm, făcând ulterior raportul dintre cele două rate de absorbție.

Conform literaturii de specialitate, ADN-ul este considerat suficient de pur, dacă raportul celor două citiri, respectiv A260/A280, are valori cuprinse în intervalul 1,7-2,0. Valorile mai mici de 1,7 indică impurificări cu proteine iar cele mai mari de 2,0 impurificări cu alți contaminanți.

Conform legii lui Beer Lambert, există o relație de liniaritate între concentrația unui compus și absorbanta sa la o anumită lungime de undă. Pe acest fapt se bazează calcularea concentrației de ADN, făcându-se aprecieri asupra purității acestuia în raport cu proteinele (Cojocaru, 2005).

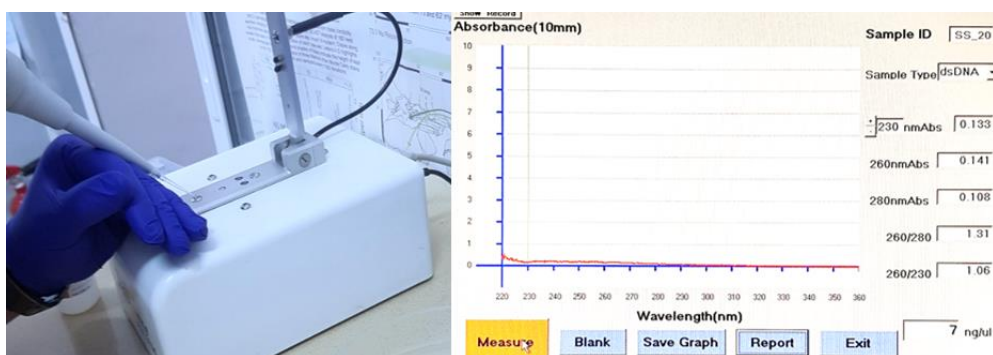


Figura 5.7. Cuantificarea probelor de ADN cu spectrofotometrul Nanodrop, ASP-3700 (foto original)

Figure 5.7. Quantification of DNA samples with the Nanodrop spectrophotometer, ASP-3700 (original photo)

Spectrofotometrul Nanodrop ASP-3700 are un spectru de măsurare cuprins între 220-750 nm și măsoară probe cu volum de 1 μ l, cu o acuratețe și o reproductibilitate foarte ridicată. Acest sistem utilizează o tehnologie performantă care implică o forță de tensionare a suprafețelor pe care se realizează măsurarea, cu scopul de a reține proba. Nanodrop ASP-3700 este dirijat de un soft special care rulează de pe PC iar datele obținute în urma fiecărei măsurători sunt stocate pe calculator (Figura 3.6.). Această tehnică elimină inconvenientul de a utiliza cuvete sau alte tipuri de recipiente pentru a depozita probele pe durata efectuării măsurătorii și de asemenea, permite igienizarea piedestalelor în doar câteva secunde.

5.3.3. Amplificarea genei citocrom b și a regiunii de control mitocondrial d-loop prin PCR

Tehnica PCR sau reacția în lanț a polimerazei, a fost dezvoltată în jurul anului 1983 de către cercetătorul Kary Mullis care a revoluționat genetica moleculară, făcând posibilă astfel, studierea și analiza genelor prin metode mult mai accesibile și foarte simple. Strategiile bazate pe această metodă au propulsat eforturi științifice uriașe, cum ar fi *Proiectul genomului uman* (Mullis, 1990; Vlaic, 1997; Kadri, 2019).

Metoda are la bază caracteristicile replicării ADN-ului cu ajutorul enzimei ADN polimeraza, care utilizează o catenă ADN ca matriță pentru sinteza unei noi catene complementare. Prin această tehnică se produce un număr foarte mare de copii ale unor secvențe de ADN (Carșai, 2008; Garibyan, 2013).

Tehnica PCR se bazează pe unele caracteristici ale replicării ADN-ului iar pentru amplificarea secvenței de ADN dorite se utilizează o secvență de oligonucleotide numită primer sau amorsă. Primerii utilizați pentru amplificare sunt de obicei, fragmente scurte, cu o lungime de aproximativ 15 – 35 nucleotide, complementare capetelor 3' ale secvenței de ADN ce se dorește a fi amplificată, fiind specifici fiecărei gene (Valasek și Repa, 2005). Pentru amplificarea secvențelor specifice de ADN, prin tehnica PCR, se folosește o soluție tampon (PCR buffer) în care se introduce ADN-ul ce conține gena de interes, primerii sintetizați, Taqpolimeraza și cele patru tipuri de deoxinucleotid-trifosfați (dATP, dGTP, dCTP și dTTP) (Nancy, 1992; Mohini și Deshpande, 2010).

Tehnica PCR presupune parcurgerea a trei etape principale, care se realizează automat într-un aparat de tip Termocycler (Weier și Grey, 1988):

1. Denaturarea ADN, presupune separarea celor două catene de ADN, proces indus prin încălzirea soluției în care se află ADN-ul, la 95°C (temperatură de denaturare) timp de 5 minute, efectul fiind ruperea legăturilor de hidrogen, rezultând ADN monocatenar (Pelt-Verkuil, 2008) (Figura 5.8.a).

2. Atașarea primerilor are loc prin răcirea la ~ 55°C a soluției în care se află secvența de amplificat. Primerii se leagă la capetele 3' a celor două catene de ADN ale genei care se dorește amplificată (Figura 5.8.b).

3. Elongația se produce la o temperatură de circa 72°C, temperatură la care Taqpolimeraza funcționează optim, în faza de extensie iar ciclul se repetă de cca. 25 – 40 ori. Amplificarea este aproximativ exponențială, realizându-se după 3 cicluri, 2 copii, după 10 cicluri 256 copii iar după 32 cicluri, până la 1,73 miliarde copii ale secvenței supuse amplificării, ș.a.m.d. (Figura 5.8.c).

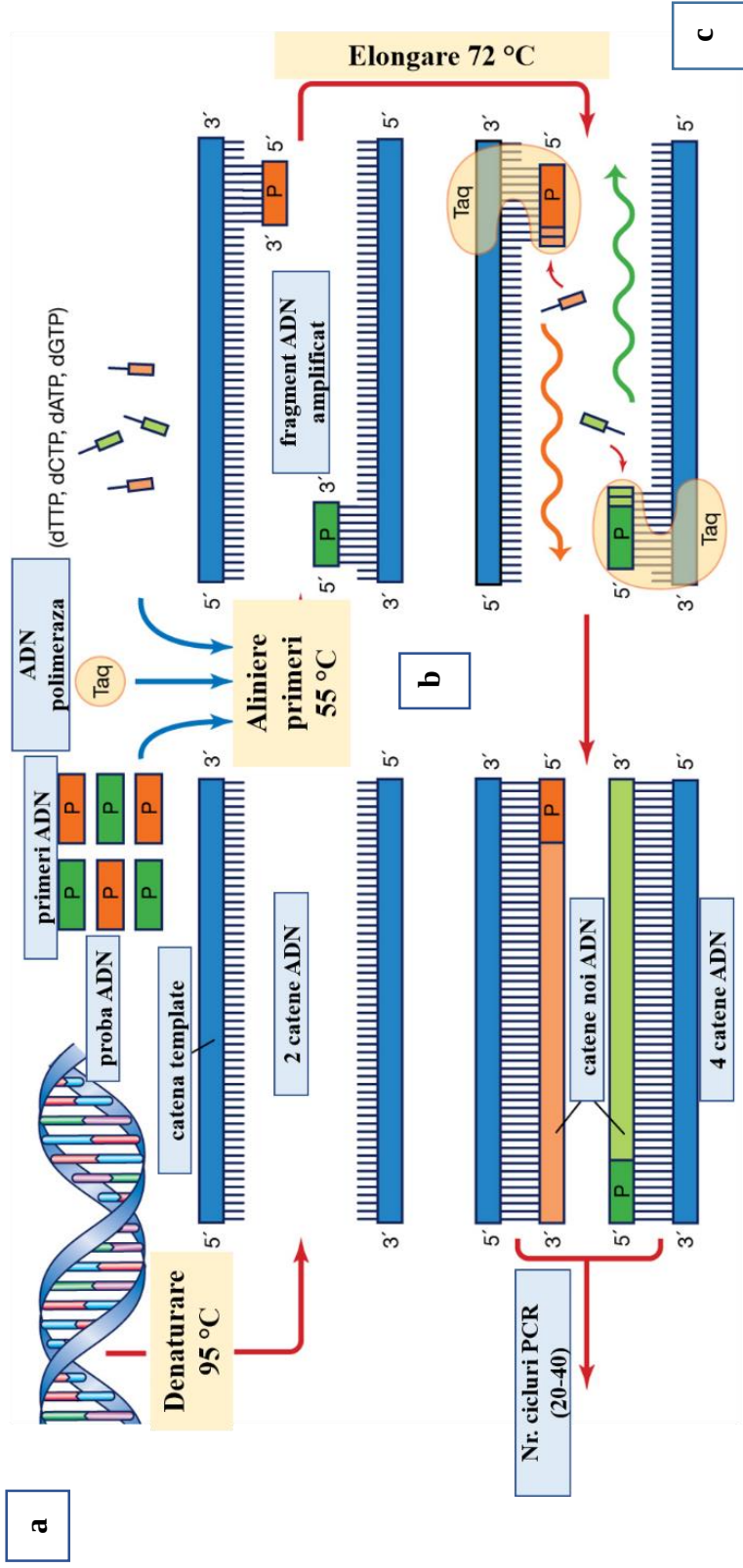


Figure 5.8. Reacția de polymerizare în lanț (PCR) **a.** Denaturare ADN; **b.** Aliniere primeri; **c.** Elongare (www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction)

Figure 5.8. Polymerase chain reaction (PCR) **a.** Denaturation DNA; **b.** Primer alignment; **c.** Elongation (www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction)

După amplificare, gena de interes se vizualizează în lumină ultravioletă, la nivelul gelului de agaroză în care fragmentele au fost colorate cu bromură de etidiu. Dacă amplificarea s-a produs corespunzător, în gel se vor observa una sau mai multe benzi, specifice secvenței de ADN.

În tehnica PCR, alegerea primerilor pentru amplificare este primordială, putând fi utilizați două tipuri de primeri:

- *primeri specifici*: secvențe cunoscute de ADN, utilizate pentru începerea sintezei unei anumite gene, cu structură cel puțin parțial cunoscută. Primerii specifici pot fi dirijați fie spre un situs foarte precis al ADN-ului, fie spre regiunile situate în amonte sau în aval de secvențele unice, la nivelul secvențelor de tipul minisateliților sau microsateliților;

- *primeri aleatori*: au dimensiuni reduse (10–20 perechi baze). Alegerea secvențelor care constituie acești primeri este complet arbitrară. În timpul reacției PCR acești primeri se vor hibrida de fiecare dată când în ADN se întâlnesc secvențe care le sunt complementare și de orientare opusă.

Reacția PCR este extrem de rapidă, durează doar câteva ore (2-3 ore pentru ~ 30 de cicluri).

5.3.4. Electroforeza în gel de agaroză pentru vizualizarea ampliconilor

Tehnica de electroforeză constă în migrarea moleculelor de ADN (molecule încărcate negativ, influențate ușor de câmpul electromagnetic) prin gelul de agaroză, spre polul pozitiv al cuvei de electroforeză (Figura 5.9) (Lewin et al., 2004; Ilie, 2008). Este o metodă standard de separare, purificare și identificare a moleculelor de ADN cu dimensiuni cuprinse între 0,5-25 kb (Voytas, 2001), inclusiv a amestecurilor care nu pot fi separate prin alte tehnici. Această tehnică se aplică pentru a verifica integritatea ADN-ului, dimensiunea fragmentelor amplificate dar și pentru a detecta prezența posibilor contaminanți.

Moleculele de ADN care prezintă aceeași lungime, respectiv aceeași greutate moleculară, vor migra cu aceeași viteză, formând benzi cu o anumită masă moleculară.

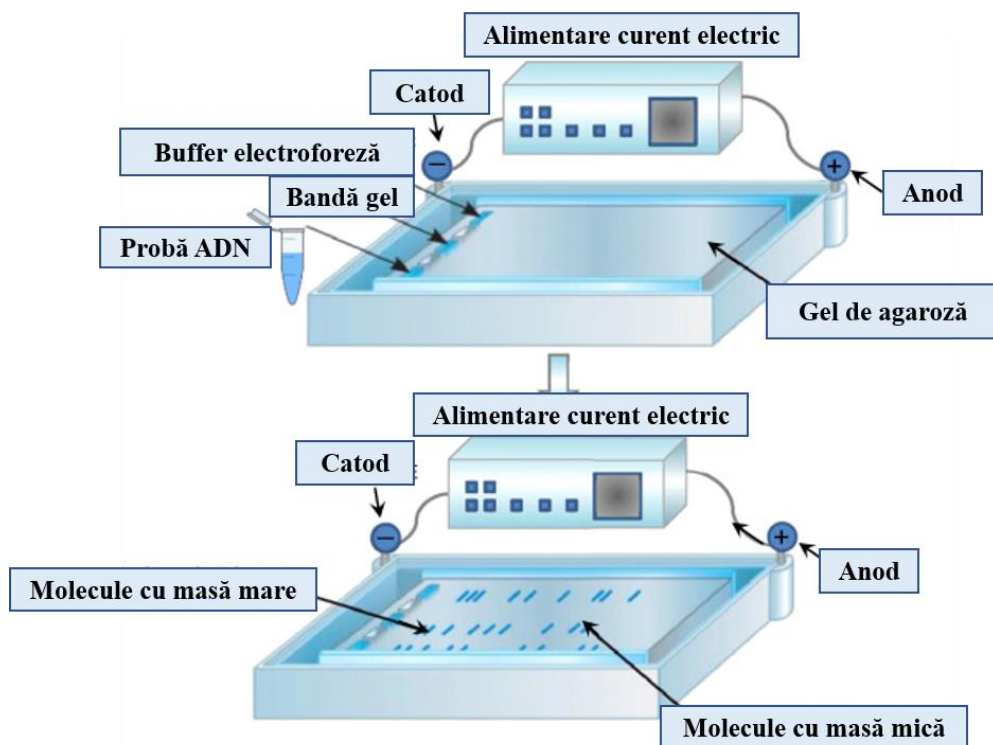


Figura 5.9. Sistem de electroforeză în gel de agaroză (prelucrare după Drabik, 2016)

Figure 5.9. Agarose gel electrophoresis system (after Drabik, 2016)

Electroforeza acizilor nucleici este o etapă obligatorie în orice protocol de analiză moleculară, urmărindu-se mai multe aspecte:

- verificarea ampliconilor obținuți prin PCR;
- specificitatea primerilor;
- mărimea fragmentelor rezultate;
- eventualele amplificări nespecifice care se pot identifica în gel;
- evitarea unor posibile contaminări (Lee, 2012).

Agaroza este izolată din alge marine din genurile *Gelidium* și *Gracilaria* sub formă de subunități repetate de agarobioză (L - și D - galactoză). Temperatura de topire este în jur de 87-89°C iar cea de solidificare este de 36-39°C. Agaroza care prezintă un punct de topire scăzut se folosește pentru recuperarea fragmentelor de ADN intact, din gelul de electroforeză (Voytas, 2001).

Mobilitatea fragmentului de ADN în interiorul gelului, este invers proporțională cu masa moleculară și poate fi influențată de o serie de factori, în funcție de care se poate optimiza separarea electroforetică: concentrația gelului în funcție de masa moleculelor ce urmează a fi separate, tensiunea aplicată care este proporțională cu viteza de migrare, tamponul de electroforeză pentru atingerea unor valori optime ale pH-ului (cele mai frecvent folosite sunt TAE: Tris-acetat-EDTA și TBE: Tris-borat-EDTA), efectul

bromurii de etidiu (colorant fluorescent utilizat pentru evidențierea benzilor de acizi nucleici, separate prin electroforeză), agenții denaturanți utilizați pentru a împiedica procesele de agregare și adsorbție a moleculelor de acizi nucleici pe matricea de gel dar și pentru înlăturarea diferențelor de natură conformațională (cei mai frecvent folosiți sunt ureea, formamida și formaldehida) (Jialiang, 2016).

5.3.5. Purificarea produșilor PCR prin coloane

Purificarea produșilor PCR se realizează cu scopul de a elimina excesul de nucleotide și primeri, principiul de bază fiind capacitatea ADN-ului de a se lega de membranele de siliciu în prezența sărurilor.

Pentru purificarea ampliconilor rezultați în urma reacției PCR, s-a folosit sistemul “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up”. Acest sistem prezintă o serie de avantaje, având la bază o membrană, care poate lega până la 40 μg ADN, permițând astfel, recuperarea fragmentelor de ADN izolate sau produși PCR, în mai puțin de 20 de minute (Brisco, 1996).

Protocolul experimental de purificare a probelor de ADN, se realizează în 4 etape:

1. Pregătirea produșilor PCR

- se adaugă în tuburile PCR un volum de reagent "Membrane Binding Solution" egal cu cel existent în tuburi.



← Pregătirea
produșilor PCR

2. Legarea ADN-ului

- se inserează minicoloanele SV în tuburile de colectare;
- se transferă produșii PCR preparați în prima etapă, în sistemul de minicoloane SV și se incubează timp de 1 minut la temperatura camerei;
- se centrifughează sistemul de minicoloane SV într-o microcentrifugă la 16.000 x g (14.000 rpm) timp de 1 minut.

**Transferul produşilor PCR în
sistemul de minicoloane SV**

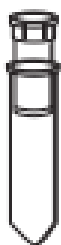


**Centrifugare
(14.500 RPM/1 min)**



3. Spălarea

- se spală coloana prin adăugarea a 700 µl soluţie pentru spălarea membranei (Membrane Wash Solution);
- se centrifughează sistemul de minicoloane SV-tub colector pentru 1 minut la 14.500 rpm;
- se goleşte tubul de colectare iar apoi se plasează minicoloana SV în tubul de colectare;
- se repetă spălarea cu 500 µl Membrane Wash Solution şi se centrifughează 5 minute la 14.500 rpm;
- se scoate ansamblul de minicoloane SV din centrifugă şi se goleşte tubul de colectare;
- se recentrifughează tuburile timp de 1 minut (cu minicentrifuga deschisă, fără capac), pentru a permite evaporarea reziduurilor de etanol.

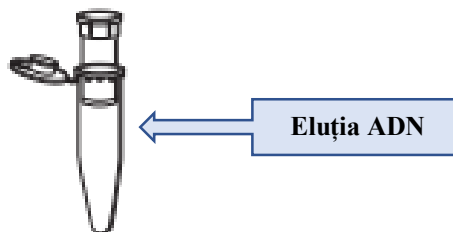


**Spălarea şi
îndepărtarea soluţiei
după centrifugare**

4. Eluţia

- se transferă cu grijă minicoloanele SV în tuburile de microcentrifugă care au un volum de 1,5 ml;

- se adaugă 50 μ l apă ultrapură (Nuclease-Free Water) în centrul coloanei fără a atinge membrana cu vârful pipetei;
- se incubează la temperatura camerei timp de 1 minut;
- se centrifughează timp de 1 minut la 14.000 rpm;
- minicoloanele SV se îndepărtează iar tuburile de microcentrifugă ce conțin ADN eluat se depozitează și se păstrează la temperaturi de 4°C sau - 20°C.



5.3.6. Secvențierea ampliconilor

Tehnica de secvențiere are ca rezultat identificarea ordinii bazelor azotate (adenină, guanină, citozină și timină), de la nivelul genelor de interes, ordine care influențează dezvoltarea și funcționarea organismelor vii. În urma reacției de secvențiere se obțin o serie de fragmente de ADN ce aparțin catenelor directă și inversă, care trebuie să se suprapună, putând fi ulterior alăturate într-o secvență unică (Sanger, 1977).

Secvențierea *SANGER* sau metoda *Finalizării catenei* (*Chain Termination*) a fost dezvoltată de Frederick Sanger și colaboratorii săi, în anul 1977, pentru care cercetătorul a obținut de două ori premiul Nobel.

Protocolul experimental de secvențiere tip Sanger implică prezența ADN-templete, purificat în prealabil, a primerilor ADN, a enzimei ADN polimerază și a amestecurilor de deoxinucleozid trifosfat (dNTP) și di-deoxinucleozid trifosfat (ddNTP). Enzima ADN polimeraza sintetizează lanțul polinucleotidic adăugând dNTP, până are loc încorporarea ddNTP-ului, timp în care se finalizează elongarea lanțului, formând un mix de lanțuri ADN cu diferite lungimi (Figura 5.10).

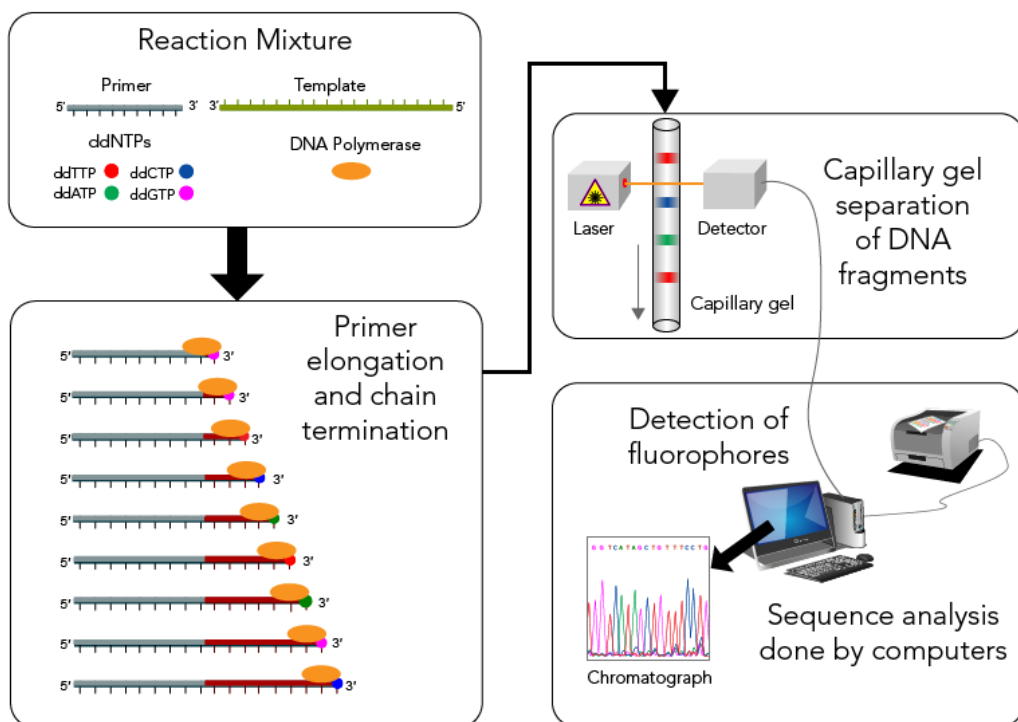


Figura 5.10. Principiul metodei Sanger de secvențiere a ADN-ului (Heather, Chain 2016)

Figure 5.10. Sanger's DNA sequencing method (Heather, Chain 2016)

În general, volumul total al reacției de secvențiere este de 20μl/probă iar cantitatea soluției de ADN pentru fiecare tub, se calculează pe baza concentrației acestuia și a dimensiunii fragmentului ce urmează a fi analizat.

5.3.7. Analiza secvențelor pentru identificarea relațiilor filogenetice în cadrul populației de bovine analizate

În scopul identificării relațiilor filogenetice din cadrul familiei *Bovidae*, cu accent deosebit pe rasele de bovine Sură de Stepă și Pinzgau, au fost descărcate atât secvențe ale genomului mitochondrial complet cât și individual pentru gena citocrom b și regiunea de control mitochondrial (d-loop), specifice raselor de bovine din grupul podolic (Sură de Stepă, Iskar Grey, Bulgarian Grey, Istrian, Slavonian Podolian, Katerini, Hungarian Grey, Podolica, Turkish Grey, etc.) din baza internațională de date (N.C.B.I.-GenBank), exportate în format FASTA pentru alinierea ulterioară în programe specifice de analiză a secvențelor genice.

Au fost realizate blocuri de alinieri, utilizând programul MEGA 6 (Tamura, 2013). Pentru fiecare individ, au fost concatenate secvențele directe și reverse cu secvențele rezultate de pe cei doi primeri și tăierea celor două catene, rezultând o secvență unică (Figurile 5.11 și 5.12).

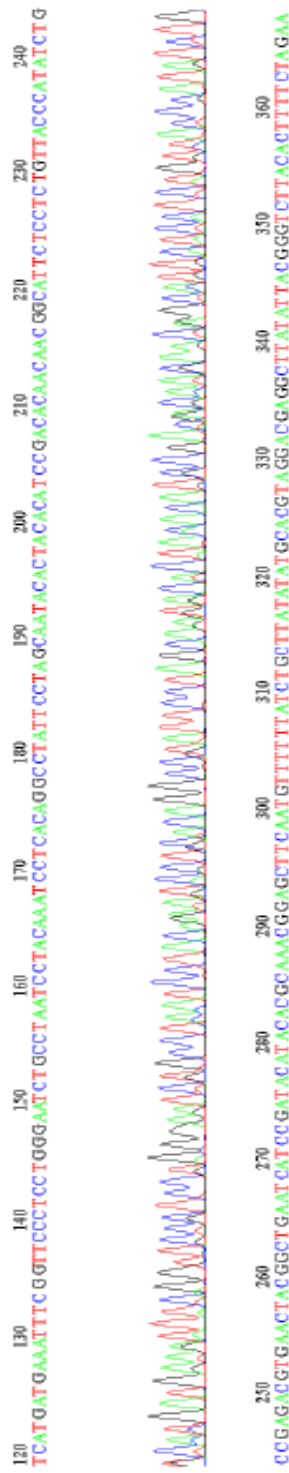


Figura 5.11. Flourograma parțială a secvenței genice citocrom b, la individul SS_03
Figure 5.11. Partial chromatogram of the cytochrome b gene sequence, individual SS_03

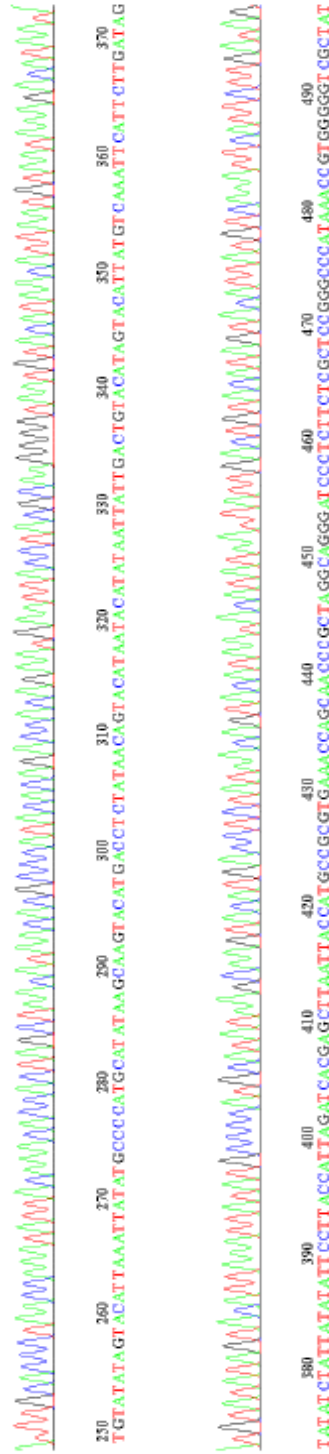


Figura 5.12. Flourograma parțială a secvenței genice d-loop, la individul P_14
Figure 5.12. Partial chromatogram of the d-loop gene sequence, individual P_14

Metodele de aliniere pentru secvențe au fost reprezentate de ClustalW (Thompson, 1994) și Clustal V (Higgins, 1994).

S-a calculat în cazul fiecărei alinieri modelul optim de substituție pe baza programului JModelTest v2.1 (Darriba, 2012).

Realizarea arborilor filogenetici și estimarea timpului de divergență, s-au realizat utilizând programul Beast v1.7.5 (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) (Drummond, 2012).

Lista programelor de analiză genetică utilizate

Pentru analiza secvențelor genice ale citocromului b și a regiunii de control mitocondrial d-loop au fost utilizate o serie de programe de analiză genetică, enumerate și prezentate în continuare.

 Secvențierea produșilor PCR: secvențiere tip SANGER în cadrul *Laboratorului de Genetică Moleculară* al Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași și în cadrul *Laboratorului Macrogen-Europe* din Olanda;

 Alinierea cromatogramelor și corectarea secvențelor brute utilizând programul DNA Baser;

 Analiza secvențelor:

- ✓ Aliniere - programul Mega X;
- ✓ Model de substituție – programul jModelTest;
- ✓ Rețea de haplotipuri – programul PopArt;
- ✓ Construcția arborilor filogenetici de tipul NJ-Neighbor Joining, ML– maximum likelihood - programul SeaView;
- ✓ Estimarea timpului de divergență – programul Beast v.1.7.5.;
- ✓ Genetică populațională – programele DnaSP 5.10 și R.

Analiza datelor	Program utilizat
Secvențierea ampliconilor ➤ <i>Secvențiere Sanger</i>	
Alinierea cromatogramelor și corectarea secvențelor brute ➤ <i>DNA Baser</i>	
Aliniere secvențe	
Model de substituție	
Rețea de haplotipuri	
Arbori filogenetici (NJ, ML)	
Estimarea timpului de divergență	
Genetică populațională	

CAPITOLUL 6
CUANTIFICAREA GRADULUI DE DIVERSITATE GENETICĂ A
INDIVIZILOR DIN RASA DE BOVINE SURĂ DE STEPĂ
CHAPTER 6
QUANTIFICATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF GREY
STEPPE CATTLE BREED

Acest capitol prezintă datele obținute în urma analizei probelor biologice și interpretarea rezultatelor prin compararea lor cu cele mai recente cercetări din literatura de specialitate. Totodată, vine în completarea informațiilor existente, cu noi informații referitoare la diversitatea genetică a rasei de bovine Sură de Stepă.

6.1. Evaluarea diversității genetice a populației de bovine din rasa Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu-Iași, pe baza analizei pedigree

Analizele demografice și genealogice sunt instrumente importante pentru a descrie structura și dinamica populațiilor de animale. Dimensiunea populației și metodele de selecție suferă modificări pentru majoritatea raselor locale, chiar și în perioade scurte de timp. Prin urmare, analiza demografică a populației ar trebui efectuată periodic pentru a evalua diversitatea genetică a rasei.

Sura de Stepă face parte din grupul de bovine podolice (*Podolian Grey Steppe*), fiind una dintre cele mai vechi rase de bovine indigene din Europa, având ca strămoș comun, cu alte rase de bovine europene (Andaluza, Romagnola, Zamorana, Salers, Podolica, Ukrainian Grey Steppe, etc.), așa numitul *Bos taurus primigenius* sau bourul sălbatic. Rasele podolice provin din câmpiile ucrainiene (stepa podoliană), de unde s-au răspândit în regiunea Balcanilor și a Mediteranei (Di Lorenzo et al., 2018), formând în timp noi rase locale.

Până în anul 1850, efectivul de bovine din România era reprezentat în principal de două rase indigene, respectiv Sura de Stepă (*Romanian Grey Steppe – RGS*) și Mocănița.

Rasa Sură de Stepă a fost larg răspândită în zonele de câmpie și deal în toată țara, până în a doua jumătate a secolului al XIX-lea, în timp ce rasa Mocănița era prezentă în cea mai mare parte în zonele montane. Din 1892, odată cu primele importuri de rase aloctone (Simmental, Schwyz, Pinzgau), rasele locale s-au confruntat cu un declin numeric accentuat. Astfel, în 1935, efectivul din rasa Sură de Stepă a scăzut la aproximativ 57,3% din efectivul total de bovine, iar în 1977 la doar 0,6% (Creangă et al., 2013) (Figura 6.1).

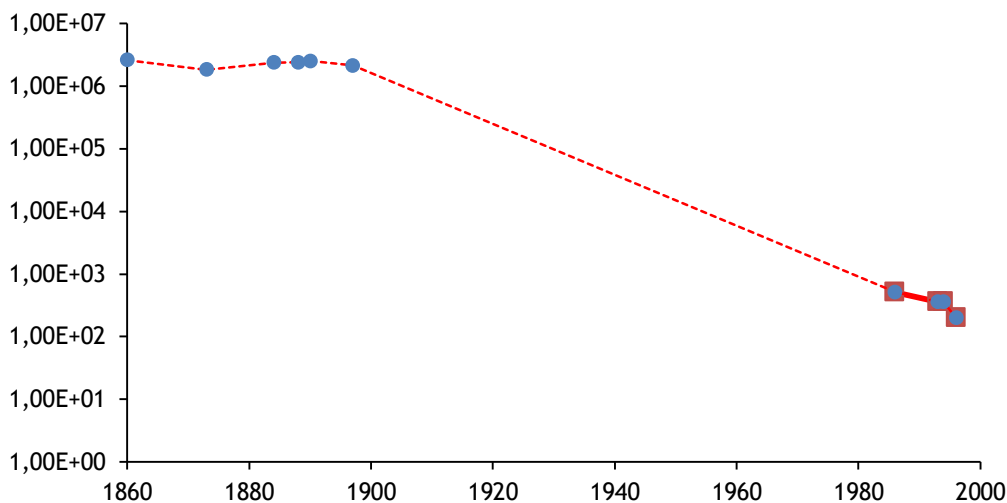


Figura 6.1. Numărul de indivizi din rasa Sură de Stepă în România (1860 - 1996)

Figure 6.1. Number of individuals of Grey Steppe breed in Romania (1860 - 1996)

Statisticile Organizației Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură (F.A.O.) referitoare la efectivul de bovine din această rasă indică faptul că în 1986 erau peste 500 de animale, în timp ce în 1996 au fost identificate doar 200 capete (Creangă et al., 2013) (Figura 6.2.).

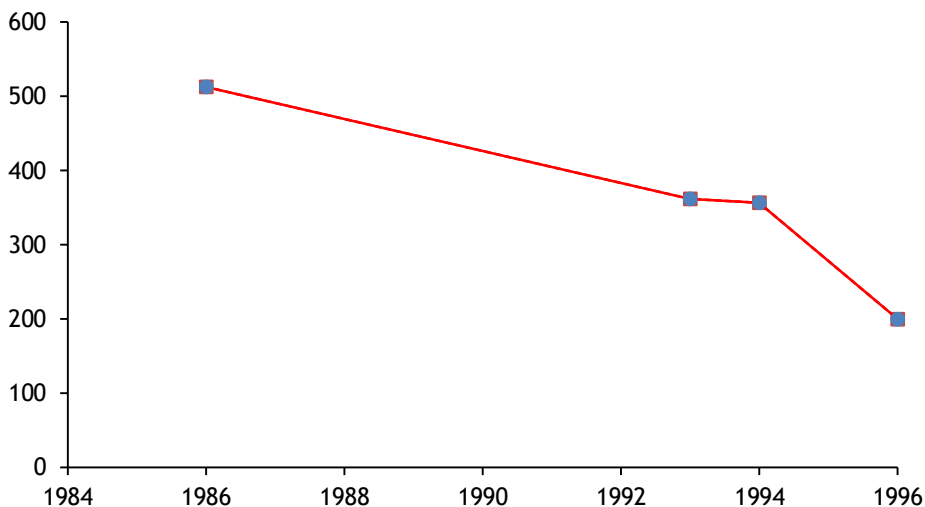


Figura 6.2. Numărul de indivizi din rasa Sură de Stepă în România (1986 - 1996)

Figure 6.2. Number of individuals of Grey Steppe breed in Romania (1986 - 1996)

În 2012, „Agenția națională de ameliorare și reproducere în zootehnie” a estimat că efectivul de bovine din rasa Sură de Stepă, ar putea fi reprezentat de exemplare de rasă pură în populațiile mici și izolate din nord-estul României și Delta Dunării, însumând un total mai mic de 150 de capete.

În ciuda productivității sale scăzute, Sura de Stepă românească reprezintă un fond genetic valoros, datorită caracteristicilor sale deosebite de adaptabilitate la condiții severe de mediu, rezistență la boli și temperaturi extreme, conținut ridicat de grăsime și proteine în lapte. Aceste caracteristici ale rasei sunt importante pentru preservarea resurselor genetice prin creșterea efectivului și reproducerea asistată a ultimelor populații rămase în România.

Din 2002, a fost elaborat un registru al rasei și s-au întreprins acțiuni pentru conservarea acesteia, in situ. Prin urmare, ultima populație care a supraviețuit este reprezentată de nucleul aflat în conservare la Stațiunea de Cercetare – Dezvoltare pentru creșterea bovinelor Dancu, Iași. S-a constatat faptul că din anul 2002 nu s-a realizat nici un studiu cu privire la statusul de risc al acestei rase de bovine aflate în pericol de extincție, folosind instrumente genealogice, cercetări esențiale pentru dezvoltarea unor strategii pe termen lung, capabile să păstreze și să restabilească în mod durabil populațiile de bovine autohtone aflate în pericol de abandon.

Acest capitol abordează o analiză amplă a structurii genetice precum și evaluarea stării de conservare și a variabilității genetice a populației de Sură de Stepă din România, pe baza datelor din pedigree.

Au fost luați în studiu un număr de 171 indivizi din rasa de bovine Sură de Stepă iar informațiile cu privire la data nașterii, data decesului, rasă, vârstă, sex, părinți, au fost preluate din registrul actual al rasei, aflat în cadrul S.C.D.C.B., Dancu. Setul de date brute a fost utilizat pentru a construi un pedigree pentru 222 de indivizi, născuți în perioada 1992 - 2019.

Toți indivizii cu date genealogice necunoscute, născuți înainte de 1995, au fost considerați ca fiind strămoși nativi ai rasei iar cei cu date genealogice necunoscute, născuți după 1995, au fost încadrați în rândul populațiilor care au migrat. De asemenea, indivizii cu aspect diferit de cel cunoscut al rasei Sură de Stepă au fost încadrați într-un grup separat.

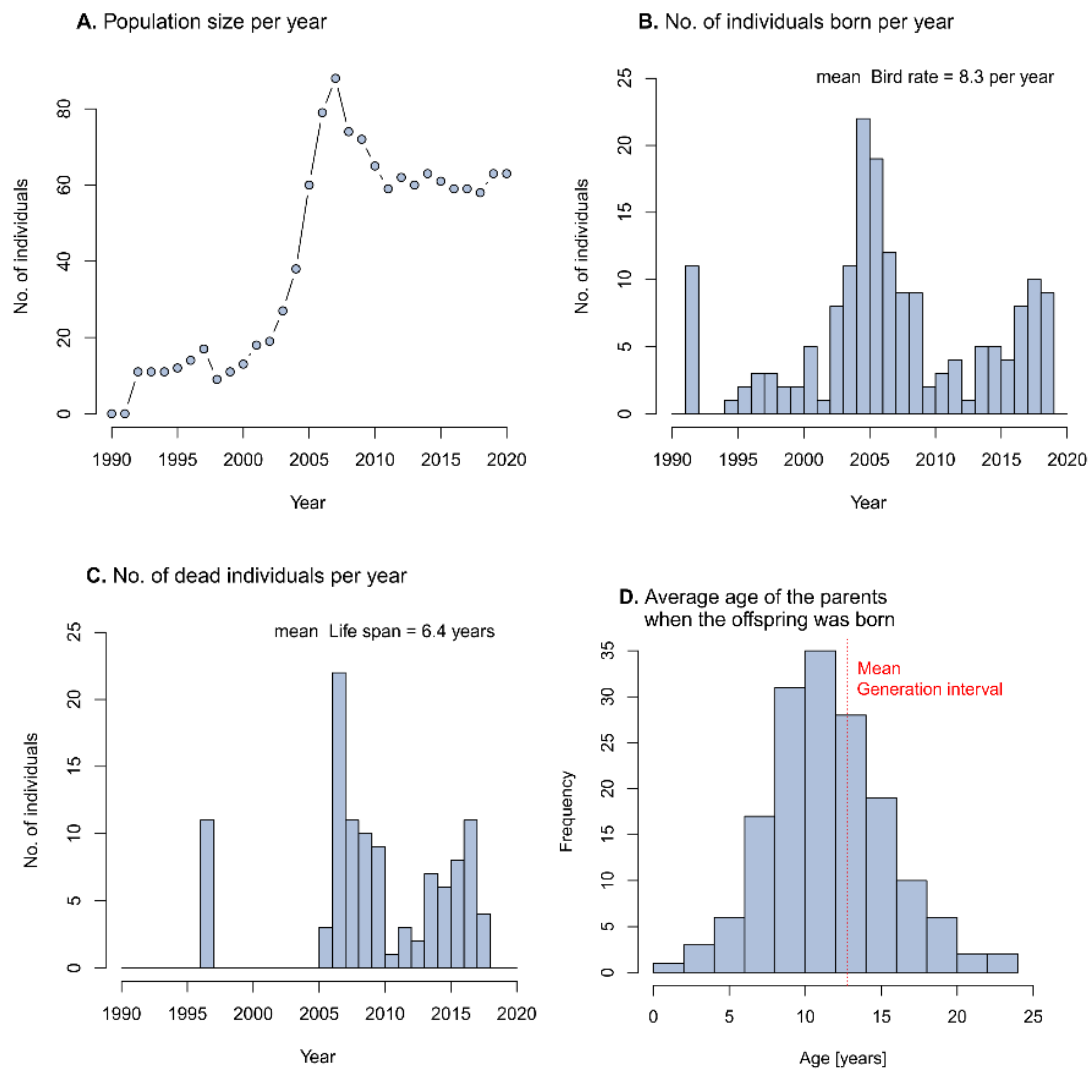
Datele au fost mai întâi evaluate pentru fiecare individ și apoi utilizate pentru a calcula: intervalul între generații (L), gradul de rudenie, pe baza analizei pedigree (fIBD), gradul de rudenie nativă (fIBD | N), native genome equivalent (NGE), coeficientul de consangvinizare (F), dimensiunea efectivă a populației (Ne), diversitatea genetică, contribuția nativă bazată pe pedigree (NPED), contribuția genetică a altor rase și selecția optimă a contribuției, utilizând pachetul R optiSel (Wellmann, 2019).

Populația de bovine din rasa Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu a fost mărită în 2002, prin inseminarea in vitro a unui număr de 19 femele, utilizând material seminal de la 11 tauri. Strămoșii masculi folosiți pentru a construi toate cele 9 linii genetice, au fost indivizi de rasă pură, cu pedigree și fenotip specific Surei de Stepă. Pe

de altă parte, exemplarele de sex feminin au prezentat diferite grade de incertitudine în ceea ce privește statutul lor de rasă pură, unele dintre ele având caracteristici nespecifice rasei.

Din anul 2002 până în prezent, au existat în total 141 de indivizi din rasa Sură de Stepă, în cadrul fermei S.C.D.C.B., Dancu.

Nucleul actual este format din 58 de indivizi, 21 masculi și 37 femele. De-a lungul timpului, dimensiunea populației a fluctuat de la 19 indivizi în 2002 la 58 de indivizi la data prezentă (Figura 6.3.A).



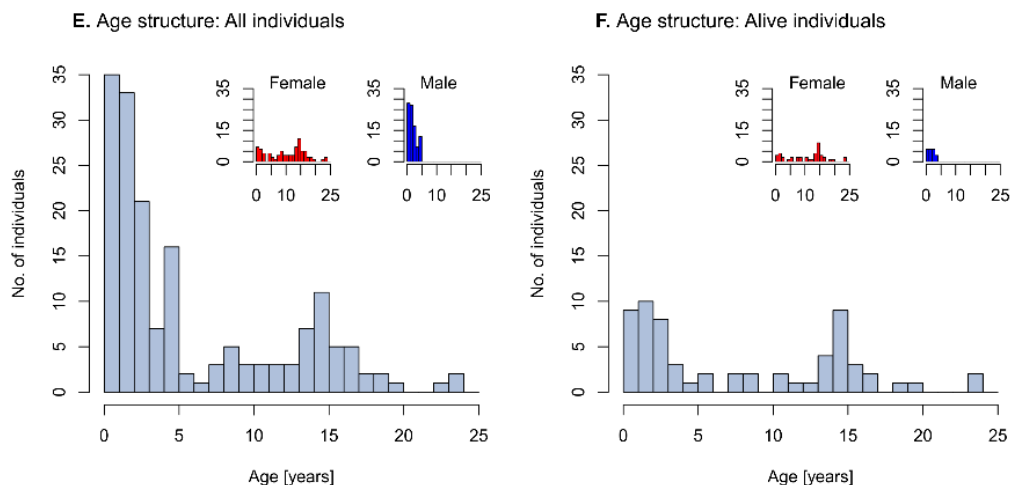


Figura 6.3. Expansiunea demografică a populației de bovine din rasa Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu-Iași, în perioada 1990-2020

A - Dimensiunea populației; B – Numărul de indivizi născuți/an; C - Numărul de indivizi morți/an;
D – Vârsta medie a părinților; E – Structura de vârstă pentru toți indivizii analizați;
F - Structura de vârstă pentru toți indivizii în viață

Figure 6.3. Demographic expansion of Grey Steppe cattle, S.C.D.C.B., Dancu-Iași, in the period 1990-2020
A - Population size/year; B - Number of individuals born/year; C - Number of dead individuals/year;
D - Average age of the parents; E - Age structure, all individuals; F - Age structure, alive individuals

Inițial, dimensiunea populației a înregistrat o fază de creștere accentuată, cu un maximum de 88 indivizi identificați în anul 2007, urmând apoi o fază scurtă de scădere a numărului de exemplare (perioada 2007-2009) iar din 2010 este stabilă la aproximativ 58 de indivizi.

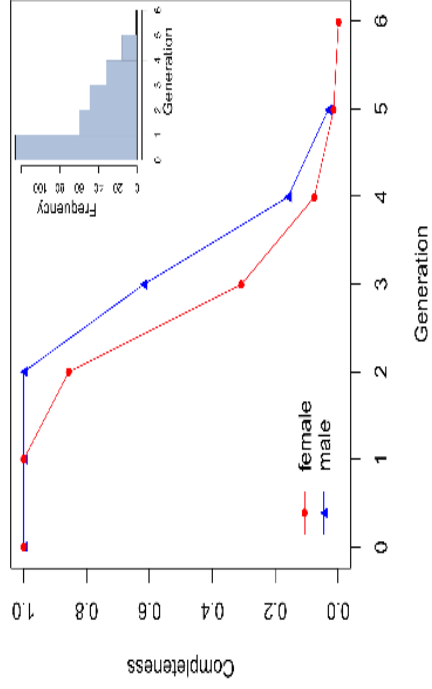
În general, raportul naștere-deces a fost pozitiv, cu o rată medie a natalității de 8,3 indivizi/an (Figura 6.3.B) și o rată medie a mortalității de 6 indivizi/an (Figura 6.3.C). Durata medie de viață a fost de doar 6,4 ani însă intervalul mediu între generații a fost destul de ridicat, 12,75 (Figura 6.3.D).

Valoarea ridicată a intervalului dintre generații este influențată de vârsta femelelor, care variază între 0 și 24 de ani (Figura 6.3.E, F), în timp ce masculii au o durată de viață de cel mult 5 ani. Pe baza datelor din pedigree au fost urmărite complet un număr de 6 generații pentru femele și 5 pentru masculi. Integritatea informațiilor din pedigree a arătat valori relativ ridicate ($<0,85$) până la generația a doua, atât pentru masculi cât și pentru femele (Figura 6.4.A, B).

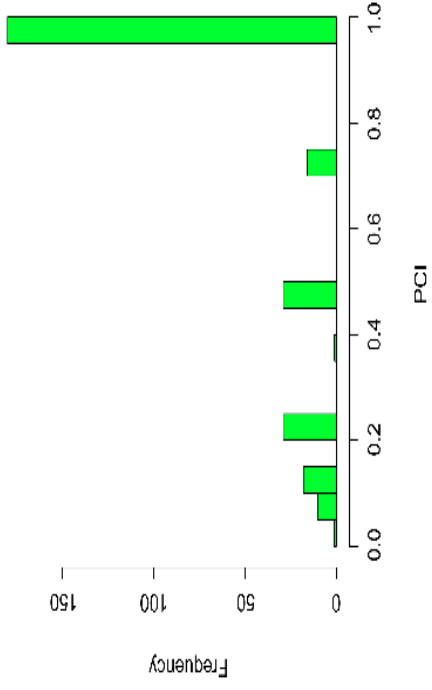
Coeficientul de consangvinizare a prezentat valori cuprinse în intervalul 0 - 0,39 (Figura 6.4.C).

Populația actuală prezintă un nivel de diversitate genetică de 94% (Figura 6.4.D). Contribuția genetică a indivizilor cu origini neclare sau cu aspect nespecific al rasei a scăzut treptat în timp, de la ~ 50% în 2002 la mai puțin de 3% în 2019 (Figura 6.4.G).

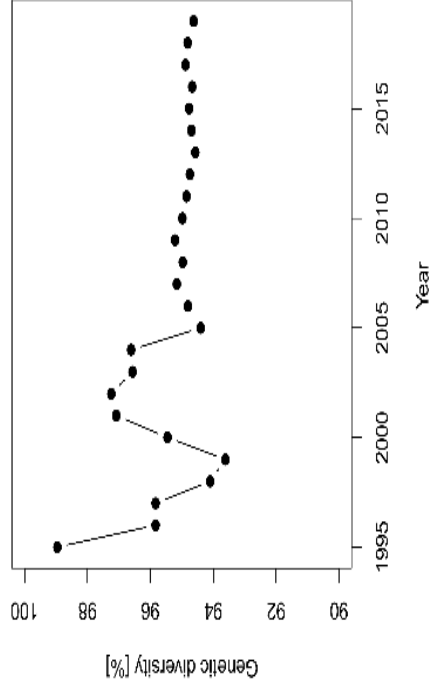
A. Completeness



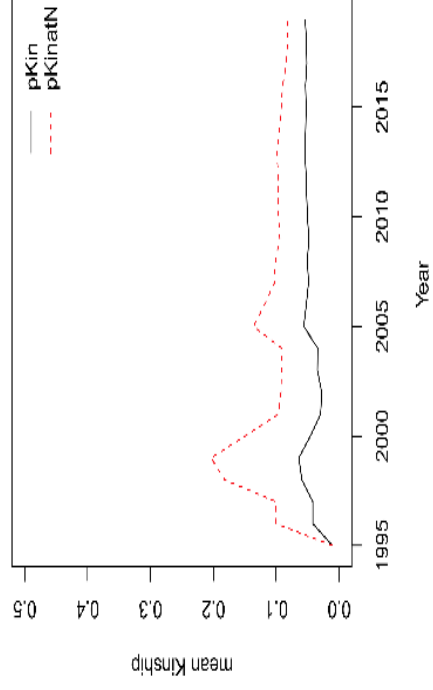
B. Pedigree Completeness



D. Genetic diversity



E. Kinships



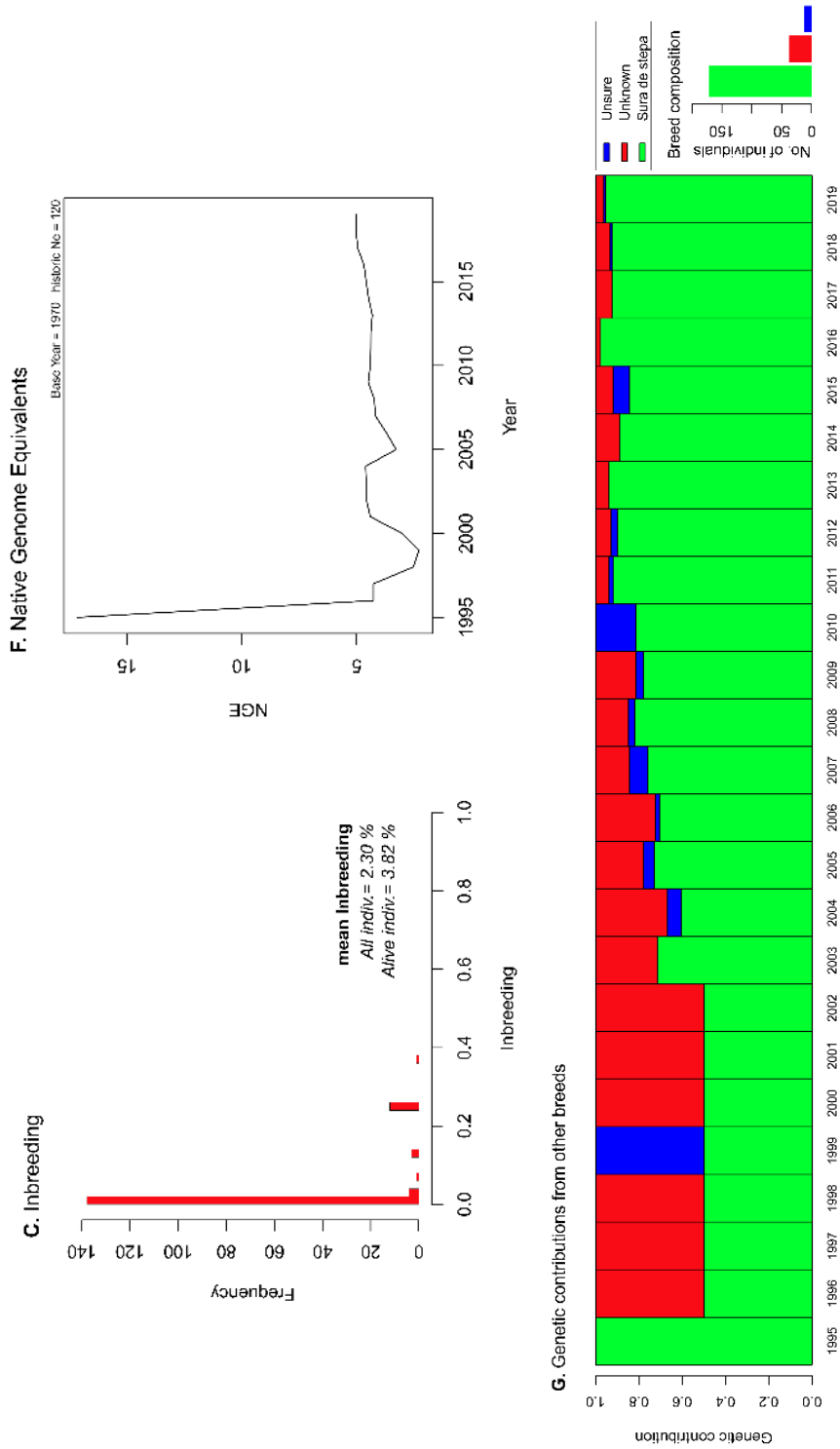


Figura 6.4. Evaluarea diversității genetice a populației din rasa Sură de Stepă pe baza datelor din pedigree
Figure 6.4. Genetic diversity of Grey Steppe population based on pedigree data

Integritatea datelor din pedigree ar trebui să fie un punct crucial în managementul genetic al unei populații de animale. Indivizilor cu părinți necunoscuți și descendenților lor li se atribuie, în general, un coeficient de consangvinizare zero chiar dacă există posibilitatea de a fi înrudiți. Dacă pedigree-ul conține un număr mare de părinți dispăruți, tendința consangvinizării într-o populație ar putea fi subestimată (Cassell et al., 2003).

Datele din pedigree-ul rasei de bovine Sură de Stepă ne-au permis să urmărim strămoșii până la șase generații.

Nucleul din cadrul S.C.D.C.B., Dancu a fost înființat în 2002, ca soluție pentru a salva de la dispariție această rasă de bovine. Prin urmare, au fost identificate 19 femele în toată România și translocate în cadrul fermei zootehnice S.C.D.C.B., Dancu. Datorită lipsei de indivizi, au fost incluse în grupul fondatorilor, chiar și exemplare cu diferite grade de incertitudine în ceea ce privește statutul lor de rasă pură.

Pentru a împiedica dispariția acestei rase, s-a apelat la tehnica de inseminare in vitro, utilizând material seminal de la 11 tauri.

Populația de Sură de Stepă a înregistrat în ultimii 13 ani un număr constant, de aproximativ 58-60 indivizi. Populația actuală de reproducere este formată din 58 de indivizi, dintre care 21 sunt masculi și 37 femele. Datorită logisticii și a materialului genetic limitat, nu s-a reușit obținerea unui nucleu consolidat (de cel puțin 200-300 de animale) pentru o bază de selecție adecvată. Cu toate acestea, raportul naștere-deces a fost pozitiv, chiar dacă s-a înregistrat o rată medie de deces de doar 6,4 ani, intervalul mediu dintre generații fiind destul de ridicat, indus în principal de vârsta femelelor și de ciclurile sexuale sezoniere (vițeii sunt crescuți împreună cu mamele lor până la momentul înțărării, care este la vârsta de ~ 6 luni).

Gradul de consangvinizare al populației indică faptul că structura efectivului a fost controlată de procesul de împerechere, populația prezentând niveluri relativ scăzute de consangvinizare.

Datele obținute arată un nivel bun de diversitate, de aproximativ 94%. Existența unui stoc constant de material seminal înghețat de la tauri certificați din rasa Sură de Stepă, permite păstrarea trăsăturilor specifice rasei.

Pentru a menține o populație de rasă pură, influența altor rase este total exclusă. Prin urmare, indivizii cu trăsături nespecifice pot fi eliminați prin procesul de selecție pentru a asigura conservarea activă a rasei. Aplicarea obiectivelor specifice ale programului de conservare pentru această rasă, care urmărește eliminarea caracterelor nedorite (care nu se încadrează în standardul rasei) a cunoscut recent un blocaj genetic sever.

Gestionarea populației din rasa Sură de Stepă, axată pe obținerea unui nucleu stabil din punct de vedere genetic, ar trebui să permită următoarele:

- creșterea numerică a populației până la un efectiv de cel puțin 200-300 de exemplare, care va oferi o bază genetică adecvată pentru menținerea rasei;

➤ scăderea intervalului dintre generații la o valoare acceptabilă pentru o rasă rustică, prin utilizarea biotehnologiilor moderne de reproducere (transfer de embrioni, fertilizare in vitro etc.);

➤ monitorizarea constantă a dimensiunii populației și a diversității genetice, utilizând instrumente moleculare.

Selecția avansată și schemele de împerechere pot fi implementate pentru a păstra resursele genetice native precum și diversitatea genetică nativă, în vederea reducerii riscului de dispariție al rasei.

Date complete cu privire la analiza genomului rasei de bovine Sură de Stepă nu sunt disponibile în prezent. Prin urmare, această cercetare se concentrează asupra analizei la nivel mitocondrial, pentru a identifica genele responsabile de caracteristicile specifice rasei.

În acest capitol se prezintă starea actuală de conservare și diversitatea genetică a rasei Sură de Stepă, pe baza datelor din pedigree. În urma analizei, se constată un nivel acceptabil de consangvinizare, având în vedere numărul mic de indivizi din populație precum și un nivel bun de diversitate genetică.

În următorii ani, obiectivul principal pentru menținerea acestei rase rustice ar trebui să fie reprezentat de o selecție mai intensă.

Metodele tradiționale de conservare a diversității genetice nu mai sunt suficiente și sigure la momentul actual. O abordare mai modernă, cum ar fi studiile de asociere la nivel de genom, ar trebui încorporată în planurile de selecție.

6.2. Cuantificarea ADN-ului total și amplificarea secvențelor genice citocrom b și d-loop

Reconstrucția istoriei evolutive a bovinelor, demonstrată prin intermediul arborilor filogenetici a fost investigată inițial pe baza caracterelor morfometrice a raselor actuale, în acord cu dovezile ancestrale. Odată cu descoperirea noilor tehnici de analiză moleculară, studiile cu privire la filogenie au fost abordate din perspectiva taxonomiei de ordin molecular.

Pentru a clarifica anumite aspecte cu privire la incertitudinile taxonomice și relațiile dintre populațiile de bovine din rasa Sură de Stepă și grupul de rase podolice, probele de ADN izolate și purificate au fost amplificate prin reacția de polimerizare în lanț (PCR), multiplicându-se exponențial o porțiune de material informațional, respectiv citocrom b (1070 pb) și regiunea de control mitocondrial d-loop (860 pb), utilizând primeri specifici.

6.2.1. Cuantificarea ADN-ului total

Etapă de cuantificare a probelor de ADN s-a realizat prin metoda spectrofotometrică, utilizând spectrofotometrul de tip nanodrop ASP-3700. Majoritatea substanțelor biologice prezintă o rată de absorbție caracteristică, în domeniul radiațiilor ultraviolete. În cazul acizilor nucleici, corespunde o rată de absorbție cu o lungime de undă $\lambda = 260$ nm iar în cazul proteinelor, $\lambda = 280$ nm.

Cantitățile de ADN extrase de la cele 32 exemplare de bovine au variat în intervalul de valori 7,0 - 28,60 ng/μl (Tabelul 6.1. și Figura 6.5.).

Raportul celor două rate de absorbție, respectiv A260/A280, a prezentat valori cuprinse între 1,03 și 1,72.

Tabelul 6.1 / Table 6.1

Cuantificarea spectrofotometrică a ADN-ului total extras din probe de sânge, rasa de bovine Sură de Stepă
Spectrophotometric quantification of total DNA extracted from blood samples, Grey Stepe cattle breed

ID	Abs260	Abs280	Abs230	260/280	260/230	Concentrație ADN	Tipul
Probă						(ng/μl)	probei
SS_01	0,573	0,354	0,701	1,62	0,82	28,60	dsDNA
SS_02	0,442	0,293	0,443	1,51	1,00	22,00	dsDNA
SS_03	0,473	0,310	0,439	1,53	1,08	23,60	dsDNA
SS_05	0,254	0,185	0,249	1,37	1,02	12,60	dsDNA
SS_06	0,183	0,120	0,183	1,53	1,00	9,10	dsDNA
SS_07	0,182	0,106	0,181	1,72	1,01	9,00	dsDNA
SS_08	0,334	0,205	0,284	1,63	1,18	16,70	dsDNA
SS_09	0,272	0,193	0,241	1,41	1,13	13,50	dsDNA
SS_10	0,159	0,113	0,168	1,41	0,95	7,90	dsDNA
SS_11	0,270	0,171	0,233	1,58	1,16	13,40	dsDNA
SS_12	0,272	0,188	0,209	1,45	1,30	13,50	dsDNA
SS_13	0,340	0,218	0,283	1,56	1,20	17,00	dsDNA
SS_14	0,379	0,254	0,392	1,49	0,97	18,90	dsDNA
SS_15	0,266	0,193	0,243	1,38	1,09	13,30	dsDNA
SS_16	0,243	0,150	0,218	1,62	1,11	12,10	dsDNA
SS_17	0,217	0,152	0,201	1,43	1,08	10,80	dsDNA
SS_18	0,244	0,154	0,188	1,58	1,30	12,20	dsDNA
SS_19	0,146	0,096	0,149	1,52	0,98	7,30	dsDNA
SS_20	0,141	0,108	0,133	1,31	1,06	7,00	dsDNA
SS_21	0,294	0,231	0,299	1,27	0,98	14,60	dsDNA
SS_22	0,265	0,214	0,248	1,24	1,07	13,20	dsDNA
SS_23	0,251	0,213	0,266	1,18	0,94	12,50	dsDNA

ID Probă	Abs260	Abs280	Abs230	260/280	260/230	Concentrație ADN (ng/μl)	Tipul probei
SS_24	0,278	0,213	0,285	1,31	0,98	13,90	dsDNA
SS_25	0,196	0,176	0,201	1,11	0,98	9,70	dsDNA
SS_26	0,255	0,213	0,253	1,20	1,01	12,70	dsDNA
SS_28	0,369	0,278	0,339	1,33	1,09	18,40	dsDNA
SS_29	0,273	0,241	0,289	1,13	0,94	13,60	dsDNA
SS_30	0,194	0,189	0,269	1,03	0,72	9,70	dsDNA
SS_31	0,279	0,232	0,273	1,20	1,02	13,90	dsDNA
SS_33	0,206	0,185	0,205	1,11	1,00	10,20	dsDNA
SS_34	0,222	0,189	0,188	1,17	1,18	11,10	dsDNA

În graficul 6.5 sunt reprezentate valorile concentrației ADN-ului în probele de sânge, care, după cum se poate observa, sunt situate în intervalul 7-28,60 ng/μl.

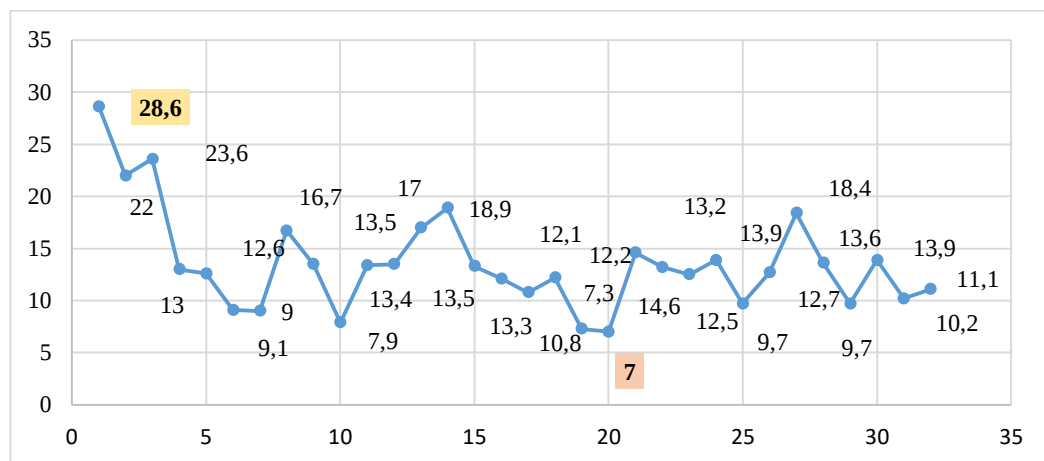


Figura 6.5. Reprezentarea grafică a valorilor concentrației ADN-ului, măsurate cu spectrofotometrul Nanodrop ASP-3700–rasa Sură de Stepă (ng/μl)-SS

Figure 6.5. Graphical representation of DNA concentration values, measured with the Nanodrop ASP-3700 spectrophotometer –Gray Steppe breed (ng/μl)

Pentru a face o comparație între valorile minimă și maximă, respectiv valoarea medie a datelor obținute cu privire la concentrația ADN-ului extras s-a realizat graficul 6.6.

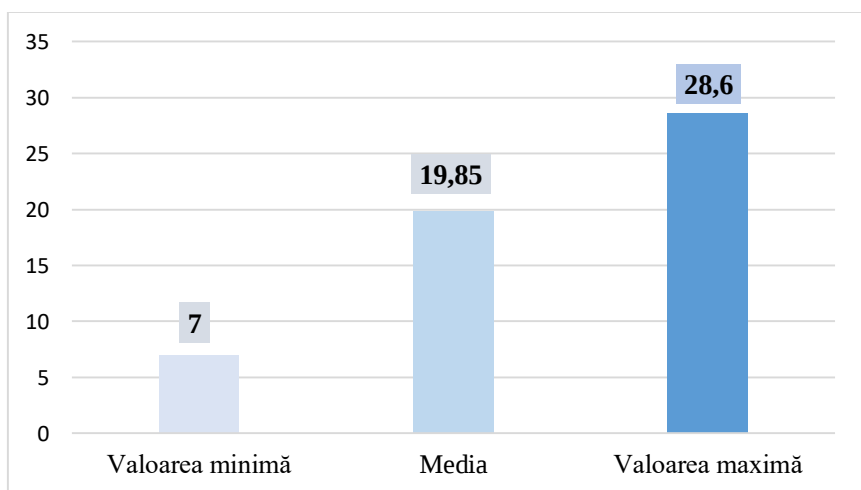


Figura 6.6. Valoarea medie a concentrației ADN-ului extras, în raport cu valorile minimă/maximă (ng/μl)
Figure 6.6. Average value of extracted DNA concentration, relative to minimum / maximum values (ng/μl)

Cele 32 probe au prezentat valori ale concentrației de ADN situate în intervalul 7,00 – 28,6 ng/μl, valoarea medie fiind de 19,85 ng/μl, demonstrându-se astfel eficacitatea metodei de extracție aplicate (Figura 6.6.).

În ceea ce privește puritatea ADN-ului extras, evaluată pe baza raportului absorbanțelor A260/A280, valorile obținute pot fi încadrate în 3 intervale (<1,7; 1,7-2,0; >2,0).

Graficul 6.7 ilustrează distribuția procentuală a celor 32 de probe, în funcție de valoarea raportului absorbanțelor A260/A280.

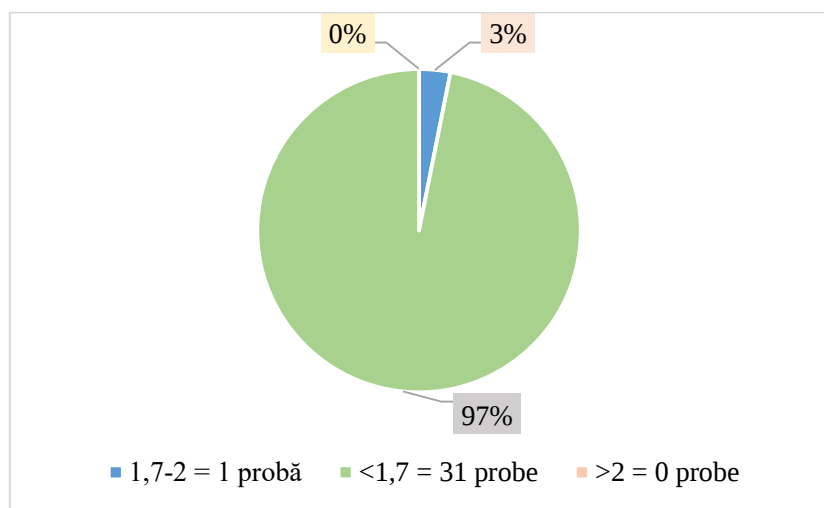


Figura 6.7. Distribuția procentuală a probelor în acord cu valoarea raportului absorbanțelor A260/A280
Figure 6.7. Percentage distribution of samples according to the value of the absorbance ratio A260/A280

Din totalul de 32 probe, 31 s-au încadrat în intervalul 1,03-1,63, ceea ce înseamnă valori <1,7. Prin urmare se poate afirma că sunt posibile contaminări nesemnificative cu substanțe de natură proteică.

Proteinele au capacitatea de a absorbi lumina UV cu o lungime de undă $\lambda=280$ nm, ceea ce duce la o creștere a valorii absorbantei și totodată o scădere a raportului absorbanțelor A260/A280, soluția în această situație fiind repetarea procesului de precipitare al proteinelor.

În cazul de față, pentru o singură probă, valoarea raportului absorbanțelor A260/A280 a fost de 1,72, deci cuprinsă în intervalul dorit (1,7-2,0) și nici o probă nu a prezentat o valoare >2,0. Prin urmare, prezența în probe a altor contaminații este total exclusă.

6.2.2. Amplificarea genică și validarea produșilor PCR prin tehnica de electroforeză în gel de agaroză

Pentru amplificarea PCR a celor doi markeri mitocondriali (citocrom b și d-loop), s-a utilizat Sistemul SENSOQUEST Labcycler Thermocycler, cu un număr de 96 termoblocuri.

La *Bos taurus*, mărimea genei citocrom b este de 1140 pb iar a regiunii de control mitocondrial d-loop este de 860 pb. Cele două perechi de primeri (forward și reverse), utilizați pentru amplificarea secvențelor genice de interes sunt fragmente de ADN cu dimensiuni cuprinse între 20-24 pb (Tabelul 6.2).

Tabelul 6.2 / Table 6.2

Caracteristicile perechilor de primeri utilizați pentru amplificarea secvențelor genice de interes prin PCR
Characteristics of the primer pairs used to amplify the gene sequences of interest by PCR reaction

Primer	Specificitate	Secvența (5'-3')	Conținut G+C (%)	Dimensiunea fragmentului (pb)
BCYT-F	Cyt-B	TTC TTA CAT GGA ATC TAA CCA TGA	33,3	24
BCYT-R	Cyt-B	GGG AGG TTA GTT GTT CTC CTT CTC	50,0	24
BRS-F	D-loop	CCT AAG ACT CAA GGA AGA AAC TGC	45,8	24
BRS-R	D-loop	CAG TGA GAA TGC CCT CTA GGT T	50,0	22

*F-forward, R-reverse

6.2.2.1. Amplificarea genică a citocromului b

Probele de ADN, izolate și purificate, au fost amplificate prin reacția de polimerizare în lanț, prin care s-a reușit o multiplicare de ordin exponențial a unor fragmente de material informațional, aparținând citocromului b și d-loop.

✚ Etapa I – amplificarea genei citocrom b, utilizând primerii Bcyt-F și Bcyt-R

Eluția primerilor Bcyt-F și Bcyt-R s-a realizat conform fișelor de însoțire ale acestora.

- Bcyt-F -> la 100 μ M + 293 μ L
- Bcyt-R -> la 100 μ M + 255 μ L

Incubare: 1h / 4°C

Alicotare: 10 μ M (+5 μ L primer, 10 μ M) +45 μ L apă distilată

Figura 6.8 reprezintă *Programul PCR* pentru reacția de amplificare a genei citocrom B, care s-a derulat într-un număr de 35 cicluri de amplificare iar în tabelul 6.3. sunt enumerate componentele mediului de reacție, necesare pentru PCR.

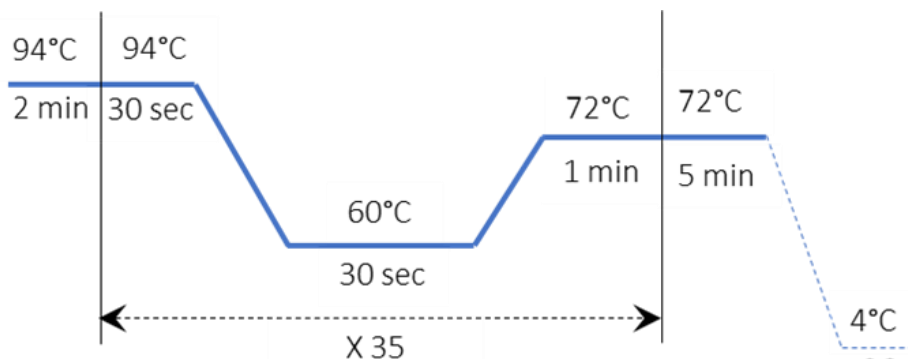


Figura 6.8. Programul PCR_Sură de Stepă, amplificare citocrom b
Figure 6.8. PCR Program_Grey Steppe, cytochrome b amplification

Tabelul 6.3 / Table 6.3

Componentele mediului de reacție necesare pentru PCR, amplificare *citocrom b*, (probe SS_01...SS_04)
 The PCR reaction mix, amplification cytochrome b (samples SS_01 ... SS_04)

Mix de reacție (GoTaq® Green Master mix)	Cantitate	x 5 => Volum final
MMix	12,5	62,5
Bcyt-F	2,5	12,5
Bcyt-R	2,5	12,5
H ₂ O	5,5	27,5
ADN	2 μ L	23 μ L

Mediul de reacție a fost pregătit într-un tub tip Eppendorf, steril, cu o capacitate de 2 ml, în care s-au adăugat toate componentele prezentate în tabelul 6.3., ținând cont de cantitățile necesare, corelate cu numărul de probe, la care s-a adăugat controlul negativ.

✚ **Etapă II – optimizarea reacției PCR (citocrom b)**

Amplificarea fiecărui fragment de ADN poate avea loc doar în condiții bine definite ale amestecului de reacție. Dacă nu se obține un rezultat PCR suficient de bun, este necesară optimizarea parametrilor reacției PCR. Scopul optimizării este acela de a garanta o amplificare specifică și eficientă, astfel, concentrația fiecărei componente a amestecului de reacție trebuie să fie corect stabilită. Pentru obținerea unor rezultate suficient de clare și concludente, s-a stabilit că este necesară o etapă suplimentară de optimizare a parametrilor PCR. În acest caz, mixul de reacție rezultat, poate fi consultat în tabelul 6.4.

Tabelul 6.4 / Table 6.4

Componentele mediului de reacție, pentru optimizarea PCR, amplificare citocrom b, (probe SS_01...SS_04)
The PCR reaction mix, required for optimization, amplification cytochrome b (samples SS_01 ... SS_04)

Mix de reacție (GoTaq® Green Master mix)	Cantitate	x 5 => Volum final
MMix	12,5	62,5
Bcyt-F	1,5	7,5
Bcyt-R	1,5	7,5
H₂O	7,5	37,5
ADN	2 μL	10 μL

* Gradient temperatură (°C) Cyt-B – 60°C...64°C

* Notă: + 0,5 μL MgCl₂

Temperatura de aliniere a primerilor a fost de 62°C, suplimentându-se mixul de reacție cu un volum de 0,5 μl MgCl₂. Ioni de magneziu sunt cofactori în activitatea polimerazei și de asemenea interacționează cu alte componente din amestecul de reacție. Prin urmare, fiecare experiment PCR necesită optimizarea concentrației de clorură de magneziu.

O concentrație prea mică de Mg²⁺ + poate duce la o amplificare scăzută iar o concentrație prea mare, la apariția unor produși nespecifici. Spre exemplu, dacă o probă de ADN conține EDTA sau alți agenți de chelare, atunci concentrația de Mg²⁺ + ar trebui să fie suplimentată.

✚ **Etapă III – amplificarea genei citocrom b pentru probele SS-05...SS-34**

Eluția primerilor Bcyt-F și Bcyt-R s-a realizat conform fișelor de însoțire ale acestora.

- Bcyt-F -> la 100 μM + 293 μL
- Bcyt-R -> la 100 μM + 255 μL

Incubare: 1h / 4°C

Alicotare: 10 μM (+5 μL primer, 10 μM)
+45 μL apă distilată

Reprezentarea grafică a condițiilor PCR, pentru citocrom b, este redată în figura 6.9. iar componentele mediului de reacție pot fi verificate, consultând tabelul 6.5.

Această etapă de optimizare, se remarcă prin adaosul în mediul de reacție a unei cantități de 0,5 μL MgCl_2 , volumul total pentru probele analizate fiind de 17 μL .

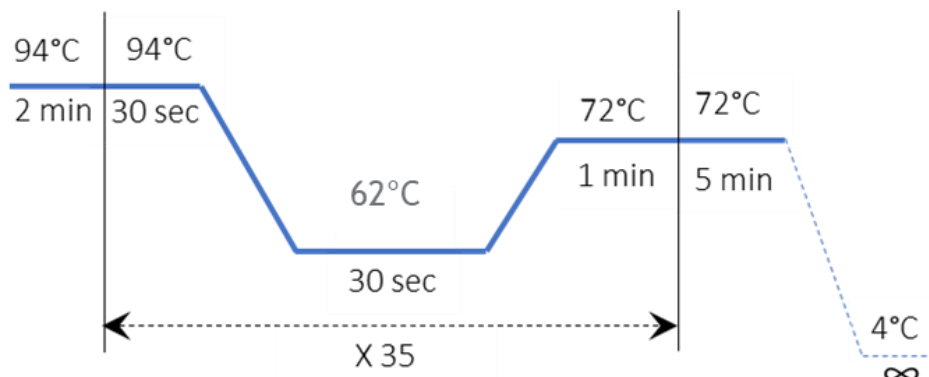


Figura 6.9. Optimizare program PCR_Sură de Stepă, amplificare citocrom b
Figure 6.9. Optimization PCR Program_Grey Steppe, cytochrome b amplification

Tabelul 6.5 / Table 6.5

Componentele mediului de reacție necesare pentru amplificarea PCR (citocrom b, probe SS_01...SS_34)
The PCR reaction mix, amplification cytochrome b (samples SS_01 ... SS_34)

Mix de reacție (GoTaq® Green Master mix)	Cantitate	x 34 => Volum final
MMix	12,5	425
MgCl_2	0,5	17
Bcyt-F	1,5	51
Bcyt-R	1,5	51
H_2O	7	238
ADN	2 μL	23 μL

Mediul de reacție a însumat un volum total de 425 μL MMmix, 017 μL MgCl_2 , 51 μL primer Bcyt-F, 51 μL primer Bcyt-R, 238 51 μL H_2O și un volum total de 23 μL probă ADN.

6.2.2.2. Amplificarea genică a regiunii de control mitocondrial d-loop

➤ Etapa IV – amplificarea genei d-loop pentru probele de ADN SS-01...SS-04

- Primeri utilizați: BRS-F, BRS-R
- Temperatura de aliniere: 60°C

În cazul amplificării regiunii de control mitocondrial d-loop, programul PCR s-a derulat într-un număr de 35 cicluri de amplificare (Figura 6.10.).

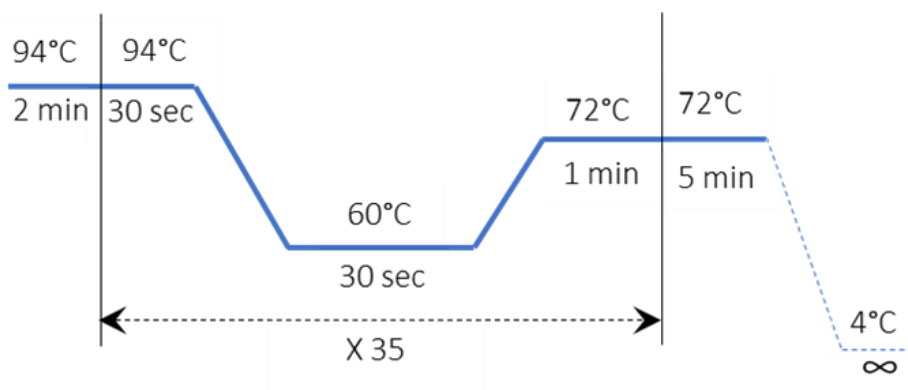


Figura 6.10. Programul PCR_Sură de Stepă, amplificare d-loop (SS-01...SS-04)

Figure 6.10. PCR Program_Grey Steppe, d-loop amplification (SS-01...SS-04)

Mixul de reacție, la care s-a adăugat un volum de 1,5 μL MgCl_2 , necesar pentru amplificarea probelor SS-01...SS-04 poate fi consultat în tabelul 6.6.

Tabelul 6.6 / Table 6.6

Componentele mediului de reacție necesare pentru reacția PCR (d-loop, probele SS-01...SS-04)

The PCR reaction mix, amplification d-loop (samples SS-01 ... SS-04)

Mix de reacție (GoTaq® Green Master mix)	Cantitate	x 5 => Volum final
MMix	12,5	62,5
MgCl_2	1,5	7,5
BRS-F	2	10
BRS-R	2	10
H_2O	7	35
ADN	2 μL	23 μL

 Etapa V–amplificarea secvenței d-loop cu un nou set de primeri pentru probele SS-01...SS-04

- Primeri: BRS-F, RBIS-R
- Temperatura de aliniere: 60°C

După amplificarea și migrarea produșilor în gel de agaroză, s-a constatat faptul că primerul forward (BRS-F) a prezentat specificitate ridicată pentru secvența genică analizată (d_loop), însă primerul reverse (BRS-R) a fost înlocuit cu primerul RBIS-R (secevență: 5'-CGCCGTACTCCTGTTADCTT-3', dimensiune - 20 pb), datorită direcției sale greșite.

În tabelul 6.7. pot fi observate componentele mediului de reacție (pentru probele SS-01...SS-04), după înlocuirea celor doi primeri reverse (BRS-R cu RBIS-R) iar în figura 6.11. se poate urmări programul PCR cu condițiile specifice de amplificare, într-un număr de 35 cicluri.

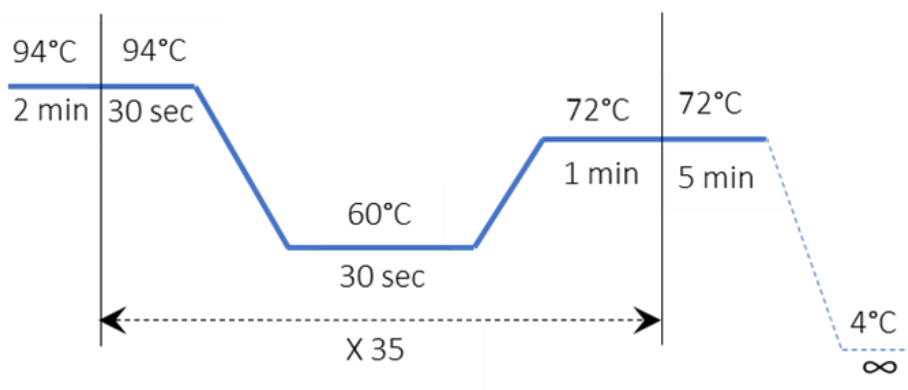


Figura 6.11. Programul PCR_Sură de Stepă, amplificare d-loop (SS-05...SS-34)

Figure 6.11. PCR Program_Grey Steppe, d-loop amplification (SS-05...SS-34)

Tabelul 6.7 / Table 6.7

Componentele mediului de reacție necesare pentru reacția PCR-set nou primeri (d-loop, SS-01...SS-04)

The PCR reaction mix, amplification d-loop with RBIS primer reverse (samples SS-01 ... SS-04)

Mix de reacție (GoTaq® Green Master mix)	Cantitate	x 5 => Volum final
MMix	12,5	62,5
BRS-F	0,5	2,5
RBIS-R	0,5	2,5
H ₂ O	9,5	47,5
ADN	2 µL	23 µL

Etapa VI – amplificarea secvenței d-loop pentru probele SS-05...SS-34

În această etapă s-a utilizat același program PCR, respectiv același set de primeri (BRS-F, RBIS-R) ca și în cazul primelor 4 probe amplificate. Amestecul de reacție poate fi consultat în tabelul 6.8.

Tabelul 6.8 / Tabelul 6.8

Componentele mediului de reacție necesare pentru PCR-set nou primeri (d-loop, probe SS-05...SS-34)

The PCR reaction mix, amplification d-loop with RBIS primer reverse (samples SS-05 ... SS-34)

Mix de reacție (GoTaq® Green Master mix)	Cantitate	x 30 => Volum final
MMix	12,5	375
Bcyt-F	0,5	15
Bcyt-R	0,5	15
H ₂ O	9,5	285
ADN	2 µL	23 µL

6.2.2.3. Validarea produşilor PCR pentru citocrom b

În prima etapă s-au amplificat 4 probe de ADN (SS-01, SS-02, SS-03, SS-04 și C-care este controlul negativ). Prin amplificarea markerilor mitocondriali utilizând metoda PCR au rezultat ampliconii care au fost verificați în gel de agaroză de concentrație 1%, realizându-se ulterior o migrare la tensiunea de 100 volți, timp de 30 minute. Pentru estimarea dimensiunii fragmentelor amplificate s-a utilizat un marker de greutate moleculară de 100 perechi de baze.

Vizualizarea ampliconilor în gel de agaroză, după migrare sub acțiunea curentului electric, se poate observa în figura 6.12.

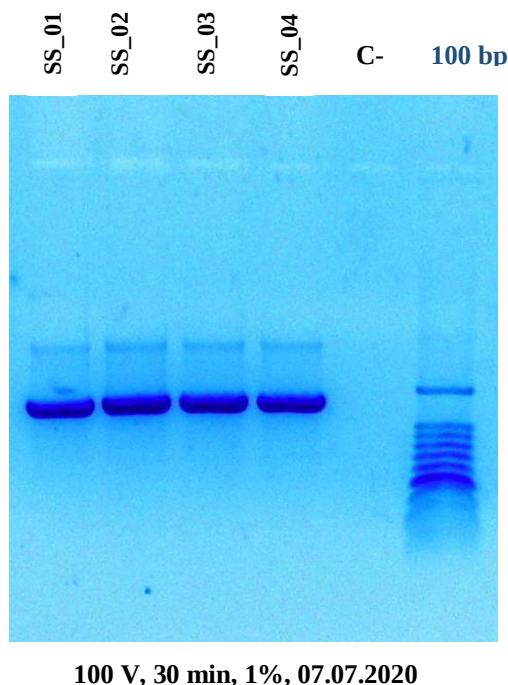


Figura 6.12. Electroforeza produşilor PCR pentru gena citocrom b la indivizii din rasa Sură de Stepă (probele SS_01...SS_04)

Figure 6.12. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons, cytochrome b (Grey Steppe, samples SS_01...SS_04)

Prin migrarea produşilor PCR în gel de agaroză s-a observat faptul că nu au existat amplificări nespecifice și nici nu au fost evidențiate contaminări, un aspect important fiind acela că primerii folosiți pentru amplificare (Bcyt-F și Bcyt-R) au prezentat un grad ridicat de specificitate pentru markerul mitocondrial Cyt-B, obținându-se astfel, un număr mare de copii ale secvenței genice de interes.

Validarea produşilor PCR în gel de agaroză, de concentraţie 1% (*probele: SS-01, SS-02, SS-03, SS-04 şi C-*), după amplificarea prin reacţia optimizată se poate observa în figura 6.13.

În acest caz, ampliconii PCR au fost analizaţi în gel de agaroză de concentraţie 1%, migrarea realizându-se la tensiunea de 70 volţi, timp de 45 minute, markerul de greutate moleculară având 100 perechi de baze.

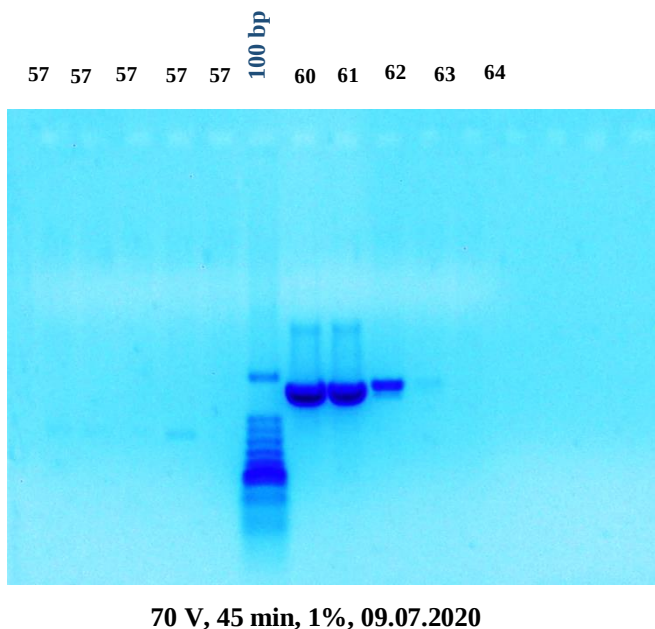
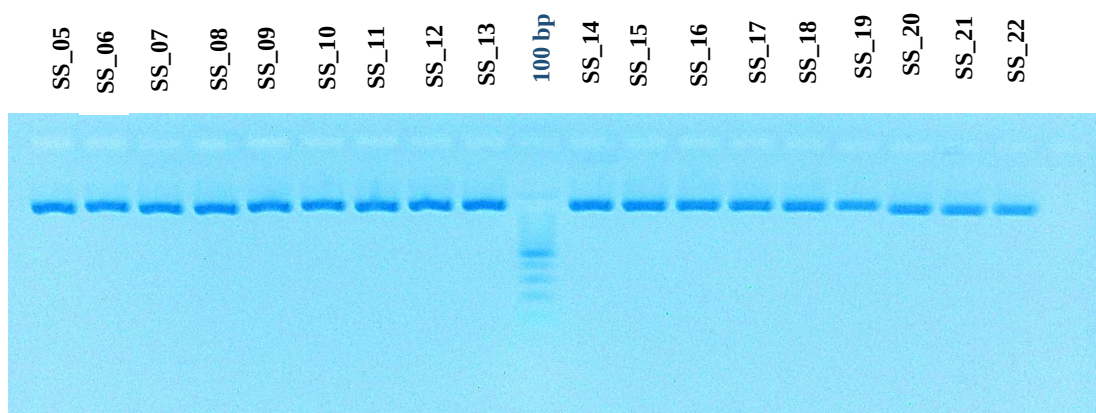


Figura 6.13. Gradient temperatură Sură de Stepă (probele SS_01...SS_04)

Figure 6.13. Gradient temperature (Grey Steppe, samples SS_01 ... SS_04)

Prin amplificarea markerului mitocondrial citocrom b, utilizând metoda PCR (probele SS_05-SS_34) au rezultat produşii PCR care au fost verificaţi în gel de agaroză de concentraţie 1%, realizându-se o migrare la 70 de volţi timp de 45 minute (Figurile 6.14. şi 6.15.). Markerul de greutate moleculară utilizat a avut o dimensiune de 100 pb.

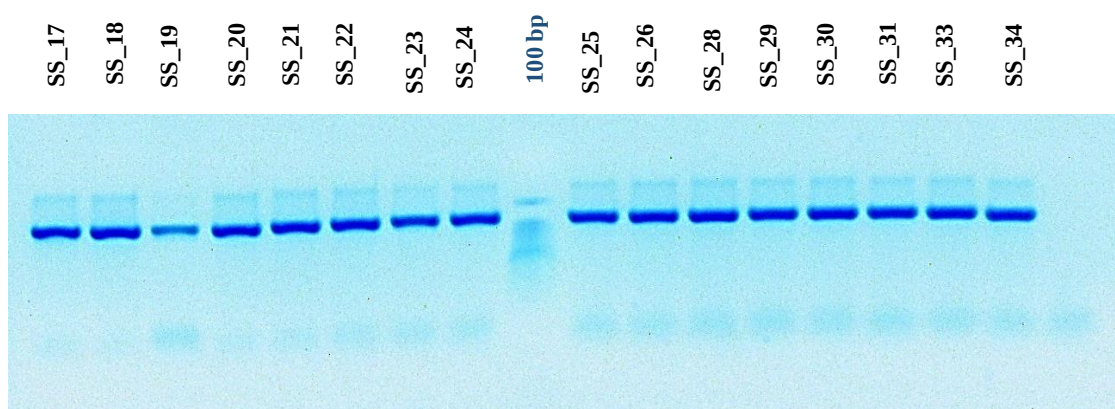
Controlul negativ notat cu C- conţine în plus faţă de mixul de reacţie, *Nucleotide Water* şi se adaugă cu scopul de a vedea eventualii produşi nespecifci existenţi în probe (dacă ADN-ul din probă s-a impurificat cu ADN străin).



70 V, 45 min, 1%, 16.07.2020

Figura 6.14. Electroforeza produșilor PCR pentru gena citocrom b la indivizii din rasa Sură de Stepă (probele SS_01...SS_16)

Figure 6.14. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons, cytochrome b (Grey Steppe, samples SS_01... SS_16)



70 V, 45 min, 1%, 09.07.2020

Figura 6.15. Electroforeza produșilor PCR pentru gena citocrom b la indivizii din rasa Sură de Stepă (probele SS_17...SS_34)

Figure 6.15. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons, cytochrome b (Grey Steppe, samples SS_17... SS_34)

După cum se poate observa și din figurile de mai sus, în cele 32 de probe analizate nu s-au evidențiat produși nespecifici sau contaminări de altă natură.

6.2.2.4. Validarea produşilor PCR pentru regiunea de control mitocondrial d_loop

Migrând produşii PCR obţinuţi în gel de agaroză (*probele SS-01, SS-02, SS-03 şi SS-04*), nu s-au depistat eventuale amplificări nespecifice (Figura 6.16).

Primerul forward (BRS-F) a prezentat specificitate ridicată pentru secvenţa genică analizată, însă primerul reverse (BRS-R) a fost înlocuit cu RBIS-R, datorită direcţiei sale greşite. Astfel, în următoarea etapă de analiză a fost testat un nou set de primeri, respectiv BRS-F şi RBIS-R.

Imaginea gelului de electroforeză după migrarea produşilor PCR pentru probele *SS-01, SS-02, SS-03 şi SS-04* este redată în figura 6.16, pentru probele *SS_05...SS_22*, în figura 6.17. iar pentru probele *SS_23...SS_34*, în figura 6.18.

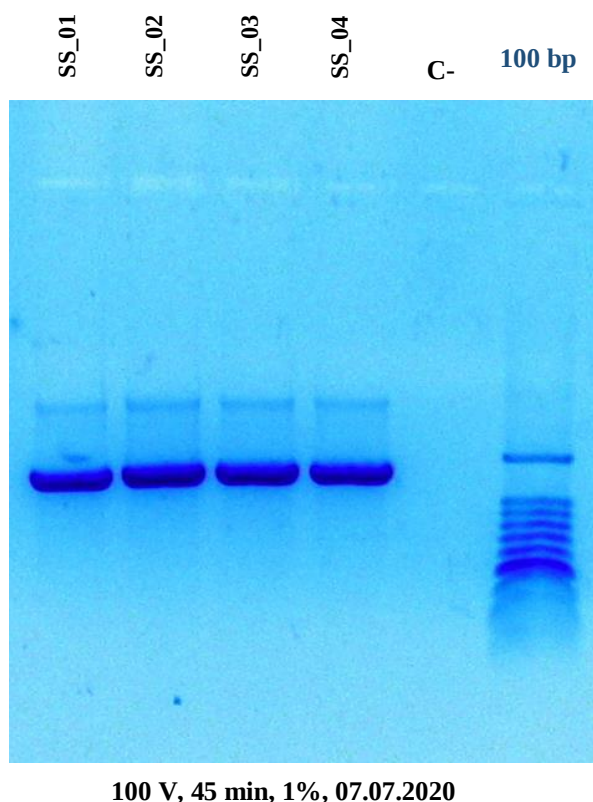


Figura 6.16. Electroforeza produşilor PCR pentru regiunea de control mitocondrial d_loop la indivizii din rasa Sură de Stepă (primeri utilizaţi: BRS-F, RBIS-R) (probele SS_01...SS_04)

Figure 6.16. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons d-loop (Grey Steppe, samples SS_01... SS_04)

Condiţiile de electroforeză în acest caz, au fost: concentraţie gel: 1%, tensiune: 70 Volţi, timp de migrare în gel: 45 minute, marker de greutate moleculară utilizat, 100 pb.

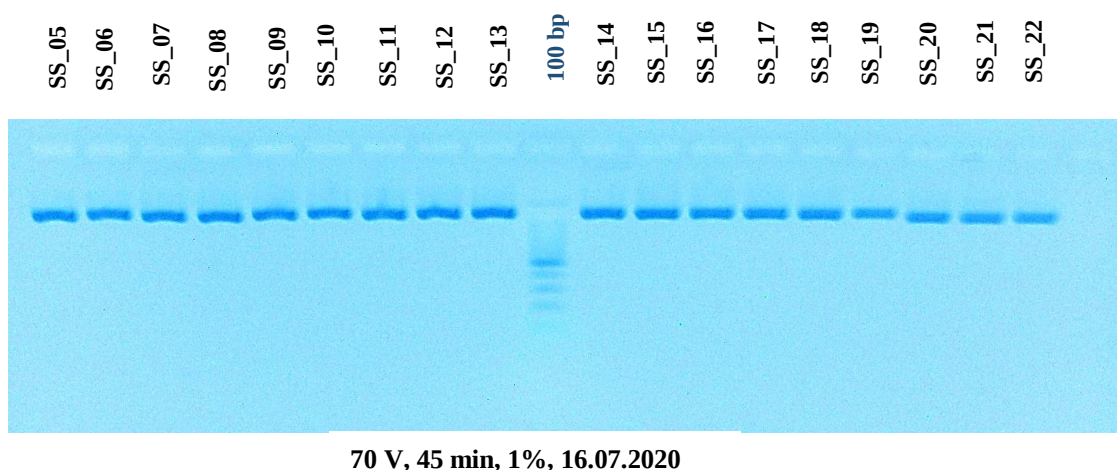


Figura 6.17. Electroforeza produșilor PCR pentru d_loop la indivizii din rasa Sură de Stepă (probele SS_05...SS_22)

Figure 6.17. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons d-loop (Grey Steppe, samples SS_05... SS_22)

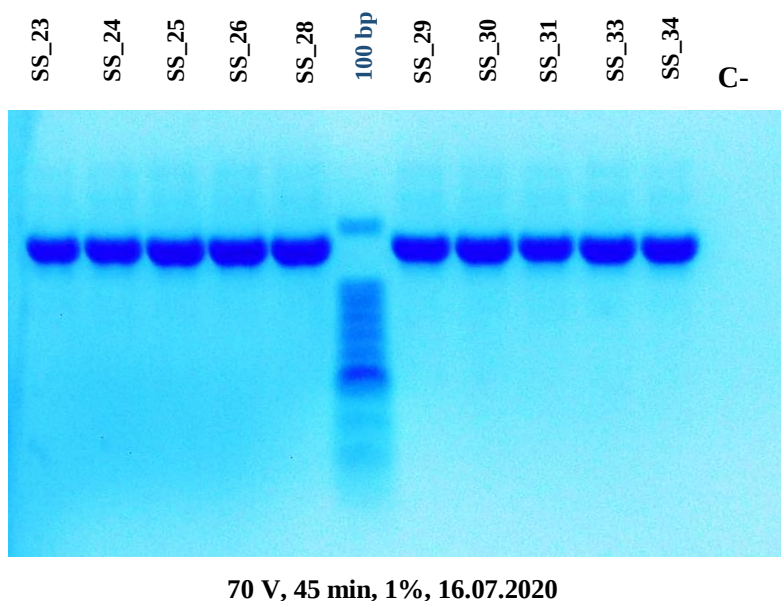


Figura 6.18. Electroforeza produșilor PCR pentru d_loop la indivizii din rasa Sură de Stepă (probele SS_23...SS_34)

Figure 6.18. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons d-loop (Grey Steppe, samples SS_05... SS_22)

Prin tehnica de electroforeză în gel de agaroză au fost validate rezultatele amplificării genice, urmărindu-se aspecte privind specificitatea primerilor, mărimea fragmentelor rezultate, eventualele amplificări nespecifice sau contaminări. Rezultatele

obținute au permis trecerea la etapa de secvențiere a ampliconilor și analiza brută a secvențelor nucleotidice.

6.3. Analiza brută a secvențelor nucleotidice la rasa Sură de Stepă

În urma reacției de secvențiere pentru fiecare dintre cei 32 indivizi din rasa Sură de Stepă analizați, s-au obținut secvențele nucleotidice corespunzătoare genei citocrom b și a regiunii de control mitocondrial d-loop. La analiza acestor secvențe, au fost adăugate secvențe ale altor rase de bovine din grupul "*Podolian Grey*", descărcate din baza de date internațională – GenBank (N.C.B.I.). În urma analizei acestor secvențe, cu diferite programe, au fost obținute o serie de rezultate care ulterior au fost interpretate și comparate cu date din literatura de specialitate. În cadrul acestui capitol, rezultatele și discuțiile au fost structurate în mai multe subcapitole, în funcție de aspectele urmărite.

6.3.1. Evaluarea frecvenței haplotipurilor prin analiza secvențelor genice ale citocromului b și a regiunii de control mitocondrial d-loop

Prin analiza și interpretarea acestor secvențe s-au identificat un număr de 4 haplotipuri, cu diferite frecvențe (T1, T2, T3/T4 și P'QT), în care au fost încadrați cei 32 indivizi studiați (Figura 6.19.).

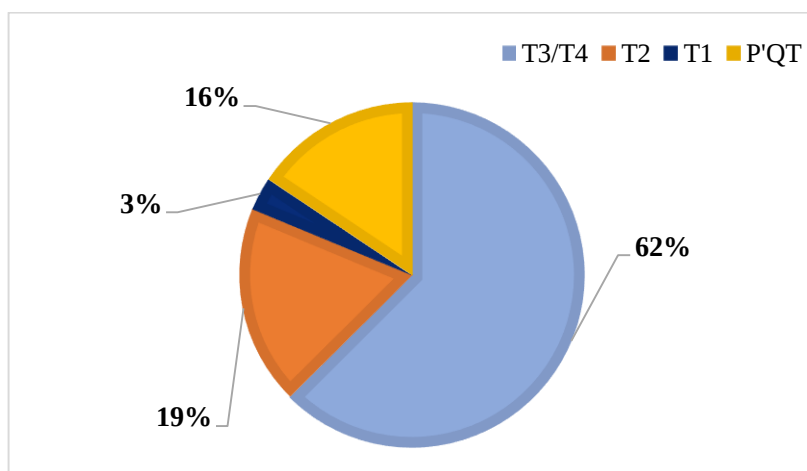


Figura 6.19. Frecvența haplotipurilor în populația de bovine din rasa Sură de Stepă
Figure 6.19. Frequency of haplotypes in Grey Steppe cattle population

Cu privire la frecvența haplotipurilor, se constată faptul că frecvența cea mai mare o reprezintă haplotipul T3/T4, fiind identificat în cazul unui număr de 20 indivizi analizați, respectiv: SS_02; SS_03; SS_04; SS_06; SS_07; SS_08; SS_09; SS_10; SS_12; SS_13; SS_14; SS_15; SS_16; SS_17; SS_20; SS_21; SS_23; SS_24; SS_29 și SS_31, însumând un procent total de 62%.

Un număr de 6 indivizi: SS_01; SS_05; SS_18; SS_19; SS_28; SS_33, s-au regăsit în haplotipul T2, cu o frecvență de 19%. Un alt haplotip identificat, cu o frecvență de 16% a fost P'QT , reprezentant pentru un număr de 5 indivizi, respectiv: SS_22; SS_25; SS_26; SS_30 și SS_34 (identificat și în analiza secvențelor nucleotidice provenite de la exemplare de taurine cu descendență directă în *Bos taurus primigenius*).

Un singur individ, identificat cu SS_11 este încadrat în haplotipul T1, care are cea mai mică frecvență, de 3%.

6.3.2. Proporția bazelor azotate în secvențele nucleotidice pentru citocrom b și d-loop

Alinierea celor 32 secvențe nucleotidice ale indivizilor din rasa Sură de Stepă s-a realizat utilizând programul MEGA X iar pe baza programului Seaview 5 s-a calculat pentru fiecare individ și respectiv pentru fiecare secvență, proporțiile celor 4 baze azotate (A, T, C, G).

În urma analizei secvenței citocromului b, s-au obținut procente medii de 31,2% pentru A, 25,1% pentru T, 30,2% pentru C și 13,4% pentru G. Pe de altă parte, după analiza secvenței regiunii de control mitocondrial d-loop, frecvența bazelor azotate a fost de 32,8% pentru A, 29,0% pentru T, 24,3% pentru C și 13,9% pentru G (Tabelul 6.9. și Figura 6.20.)

Tabelul 6.9 / Table 6.9

Frecvența bazelor azotate pentru secvențele SS_citocrom b și SS_d-loop
Nitrogen base frequency for SS_cytochrome b and SS_d-loop sequences

Secvența	Frecvența			
	A %	T %	C %	G %
SS-Cyt_B	31,2	25,1	30,2	13,4
SS-D_loop	32,8	29,0	24,3	13,9

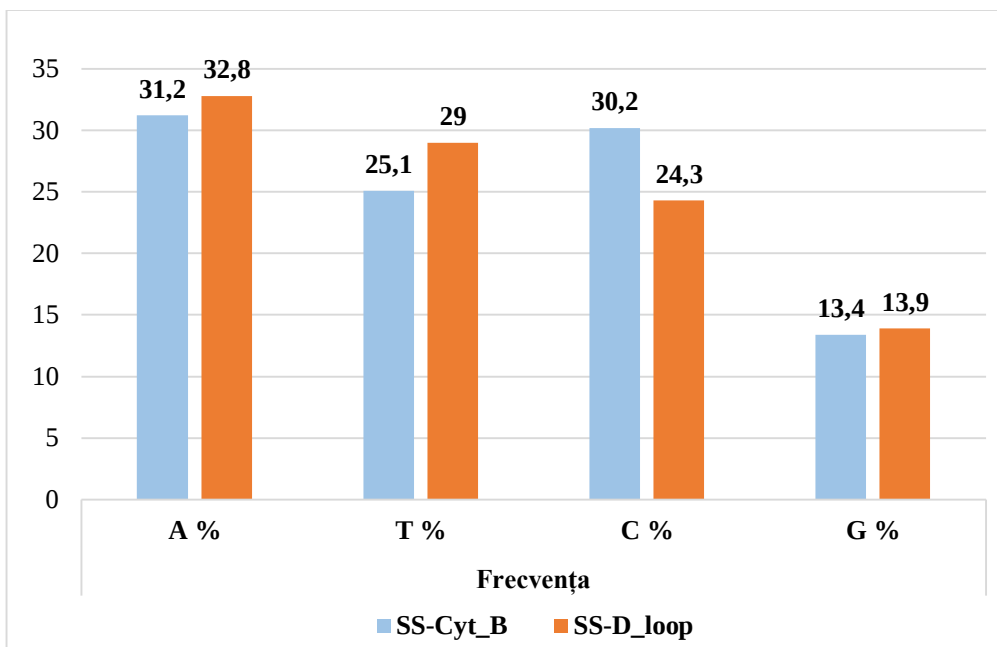


Figura 6.20. Reprezentarea grafică a frecvenței bazelor azotate pentru secvențele SS_citocrom b și SS_d_loop

Figure 6.20. Graphical representation of the frequency of nitrogenous bases for the sequences SS_cytochrome b and SS_d_loop

Frecvența celor 4 nucleotide pentru secvența citocrom b, pentru cei 32 indivizi studiați poate fi consultată în Tabelul 6.10.

Tabelul 6.10 / Table 6.10

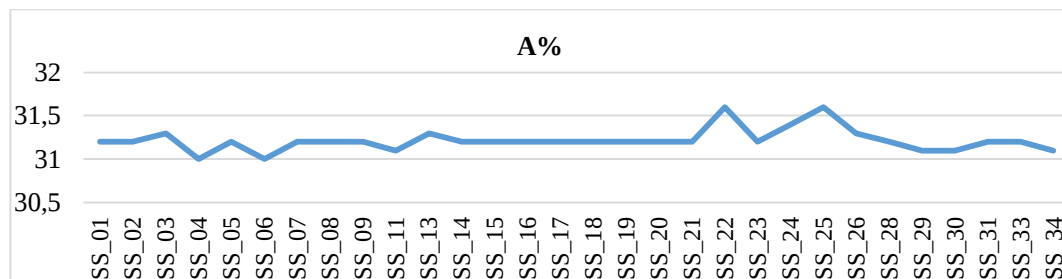
Proporția bazelor azotate pentru indivizii din rasa Sură de Stepă (citocrom b)

Proportion of nitrogenous bases for Gray Steppe individuals (cytochrome b)

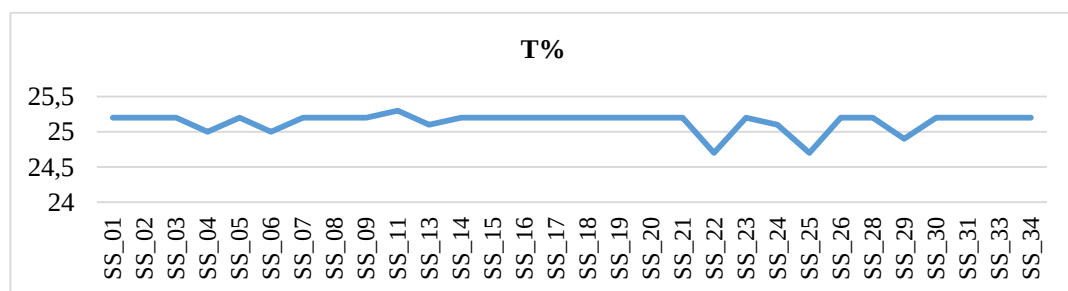
Nume probe	A %	T %	C %	G %
SS_01	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_02	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_03	31,3	25,2	30,2	13,3
SS_04	31,0	25,0	30,4	13,6
SS_05	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_06	31,0	25,0	30,4	13,6
SS_07	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_08	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_09	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_11	31,1	25,3	30,1	13,5
SS_13	31,3	25,1	30,3	13,3
SS_14	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_15	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_16	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_17	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_18	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_19	31,2	25,2	30,2	13,4

Nume probe	A %	T %	C %	G %
SS_20	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_21	31,2	25,2	30,2	13,5
SS_22	31,6	24,7	30,2	13,5
SS_23	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_24	31,4	25,1	30,2	13,3
SS_25	31,6	24,7	30,2	13,5
SS_26	31,3	25,2	30,2	13,4
SS_28	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_29	31,1	24,9	30,4	13,6
SS_30	31,1	25,2	30,2	13,5
SS_31	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_33	31,2	25,2	30,2	13,4
SS_34	31,1	25,2	30,2	13,5

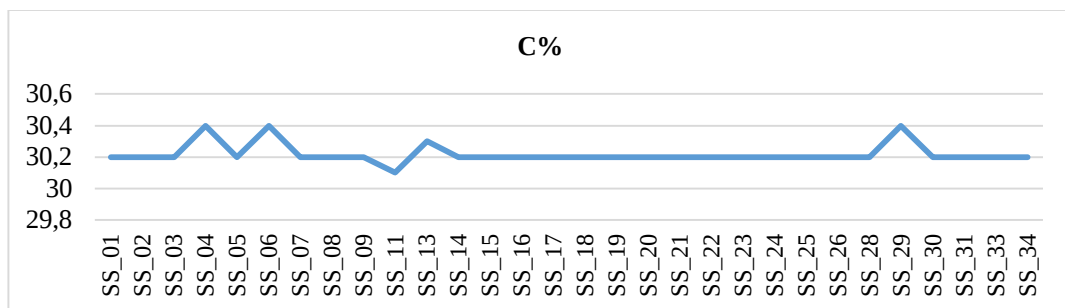
Procentele minim și maxim pentru A, au fost de 31% respectiv 31,6%, cu o medie de 31,21% (Figura 6.21.a). În cazul timinei, procentul mediu obținut în urma analizei celor 32 secvențe ale citocromului b a fost de 25,14% cu valori cuprinse în intervalul 24,7-25,3% (Figura 6.21.b). Citozina a prezentat valori între limitele 30,1-30,4%, cu o medie de 30,22% (Figura 6.21.c) iar guanina a avut o frecvență medie de 13,43% cu limite în intervalul 13,3-13,6% (Figura 6.21.d).



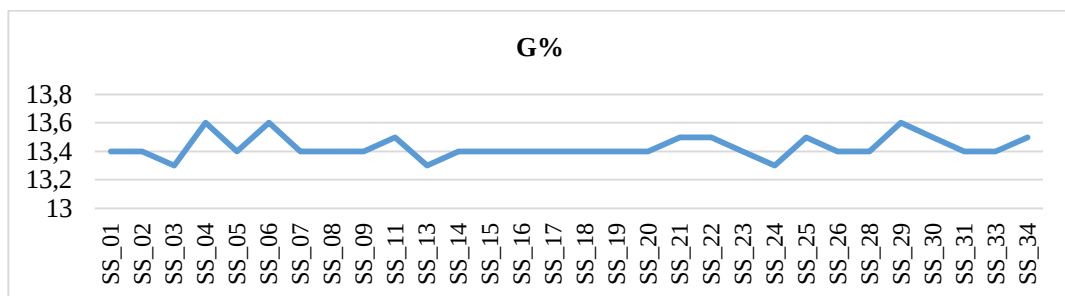
a.



b.



c.



d.

Figura 6.21. Concentrațiile de baze azotate ale secvențelor pentru gena citocrom b

a. adenină-A; b. timină-T; c. citozină-C; d. guanină-G

Figure 6.21. Nitrogen base concentrations of cytochrome b gene sequences

a. adenine-A; b. thymine-T; c. cytosine-C; d. guanine-G

În cazul analizei secvențelor regiunii de control mitocondrial d-loop, frecvența bazelor azotate poate fi consultată în Tabelul 6.11.

Tabelul 6.11 / Table 6.11

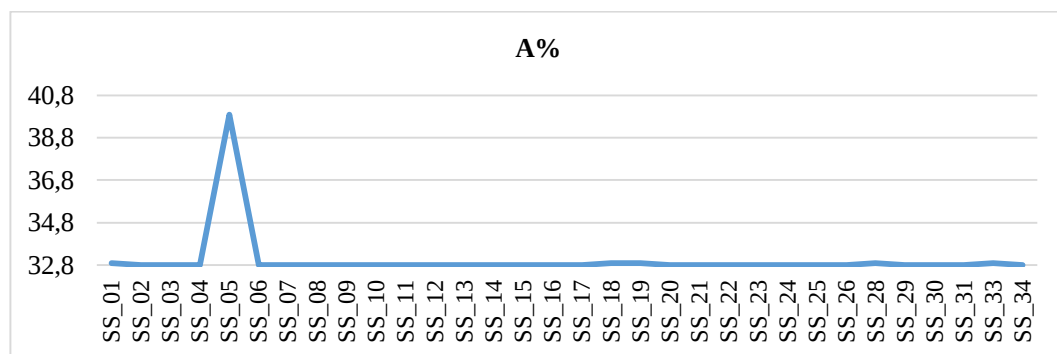
Proporția bazelor azotate pentru indivizii din rasa Sură de Stepă (d_loop)

Proportion of nitrogenous bases for Gray Steppe individuals (d_loop)

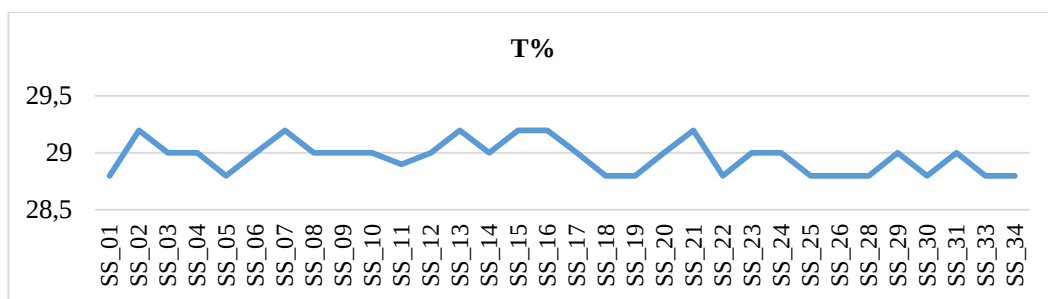
Nume probe	A %	T %	C %	G %
SS_01	32,9	28,8	24,6	13,6
SS_02	32,8	29,2	24,2	13,9
SS_03	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_04	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_05	39,9	28,8	24,6	13,6
SS_06	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_07	32,8	29,2	24,2	13,9
SS_08	32,8	29,0	24,3	13,9
SS_09	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_10	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_11	32,8	28,9	24,4	13,9

Nume probe	A %	T %	C %	G %
SS_12	32,8	29,0	24,3	13,9
SS_13	32,8	29,2	24,2	13,9
SS_14	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_15	32,8	29,2	24,2	13,9
SS_16	32,8	29,2	24,2	13,9
SS_17	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_18	32,9	28,8	24,6	13,6
SS_19	32,9	28,8	24,6	13,6
SS_20	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_21	32,8	29,2	24,1	14,0
SS_22	32,8	28,8	24,5	13,9
SS_23	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_24	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_25	32,8	28,8	24,5	13,9
SS_26	32,8	28,8	24,5	13,9
SS_28	32,9	28,8	24,6	13,6
SS_29	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_30	32,8	28,8	24,5	13,9
SS_31	32,8	29,0	24,2	14,0
SS_33	32,9	28,8	24,6	13,6
SS_34	32,8	28,8	24,5	13,9

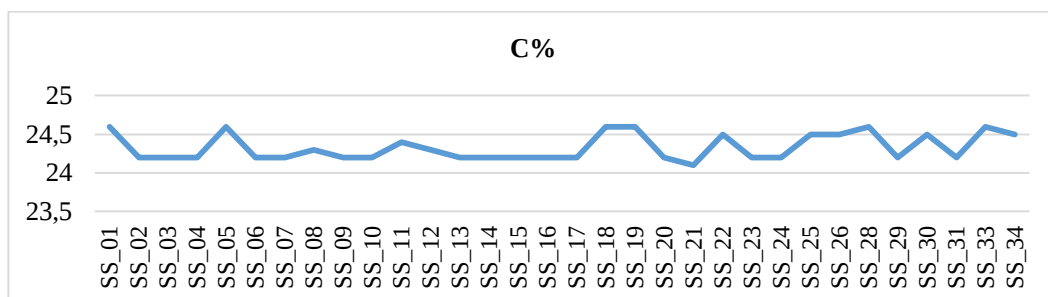
Procentul mediu de adenină pentru cei 32 indivizi analizați a fost de 33,03%, cu variații între 32,8 și 39,9%, cea mai frecventă valoare fiind 32,8% (Figura 6.22.a). Timina a înregistrat procente cuprinse între valorile 28,8-29,2%, cu o medie de 28,96% iar cea mai frecventă valoare a fost de 29,0% (Figura 6.22.b). În cazul citozinei, procentele au fost cuprinse între 24,1-24,6%, cu o valoare medie de 24,33%. Pentru această nucleotidă, cea mai frecventă valoare a fost 24,2% (Figura 6.22.c). Pentru guanină, cea mai frecventă valoare a fost 14,0%. Media procentelor obținute a fost de 13,88% iar intervalul de valori a fost situat între 13,6 și 14,0% (Figura 6.22.d).



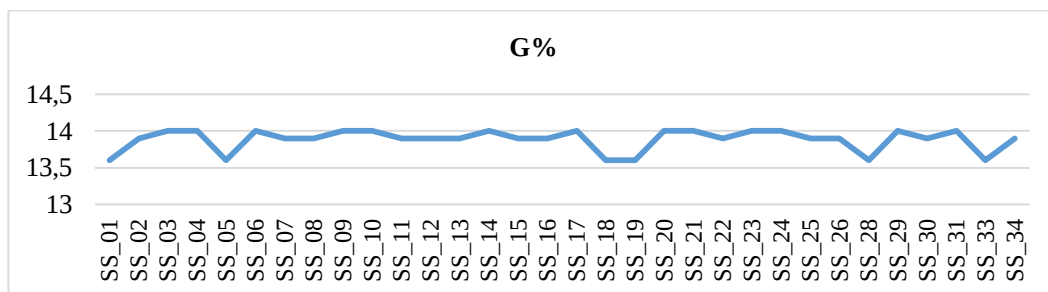
a.



b.



c.



d.

Figura 6.22. Concentrațiile de baze azotate ale secvențelor pentru regiunea de control mitocondrial d-loop
a. adenină-A; **b.** timidină-T; **c.** citozină-C; **d.** guanină-G

Figure 6.22. Nitrogen base concentrations of d-loop gene sequences
a. adenine-A; **b.** thymine-T; **c.** cytosine-C; **d.** guanine-G

6.3.3. Coeficientul de specificitate

Valoarea coeficientului de specificitate este dată de raportul $A+T/C+G$ și arată diferențele dintre indivizii unei specii. Acest coeficient se calculează în studiile de filogenie moleculară cu scopul de a observa diferențele la nivelul compoziției nucleotidice. În mod normal, acesta are valori cuprinse în intervalul 1,2-1,5, caracteristice majorității speciilor de animale. Atât pentru secvențele nucleotidice ale citocromului b cât

și a regiunii de control mitocondrial d-loop, s-a calculat coeficientul de specificitate. Valorile rezultate pot fi consultate în Tabelele 6.12 și 6.13.

Tabelul 6.12 / Table 6.12

Coeficientul de specificitate al indivizilor din rasa Sură de Stepă (citocrom b)

Specificity coefficient of Gray Steppe individuals (cytochrome b)

Nume probe	A+T %	G+C %	A+T/G+C
SS_01	56,4	43,6	1,29357798
SS_02	56,4	43,6	1,29357798
SS_03	56,5	43,5	1,29885057
SS_04	56,0	44,0	1,27272727
SS_05	56,4	43,6	1,29357798
SS_06	56,0	44,0	1,27272727
SS_07	56,4	43,6	1,29357798
SS_08	56,5	43,5	1,29885057
SS_09	56,5	43,5	1,29885057
SS_11	56,4	43,6	1,29357798
SS_13	56,4	43,6	1,29357798
SS_14	56,5	43,5	1,29885057
SS_15	56,4	43,6	1,29357798
SS_16	56,4	43,6	1,29357798
SS_17	56,5	43,5	1,29885057
SS_18	56,4	43,6	1,29357798
SS_19	56,4	43,6	1,29357798
SS_20	56,4	43,6	1,29357798
SS_21	56,3	43,7	1,28832951
SS_22	56,3	43,7	1,28832951
SS_23	56,5	43,5	1,29885057
SS_24	56,5	43,5	1,29885057
SS_25	56,3	43,7	1,28832951
SS_26	56,3	43,7	1,28832951
SS_28	56,4	43,6	1,29357798
SS_29	56,0	44,0	1,27272727
SS_30	56,3	43,7	1,28832951
SS_31	56,5	43,5	1,29885057
SS_33	56,4	43,6	1,29357798
SS_34	56,3	43,7	1,28832951

Tabelul 6.13 / Table 6.13

Coeficientul de specificitate al indivizilor din rasa Sură de Stepă (d_loop)

Specificity coefficient of Gray Steppe individuals (d-loop)

Nume probe	A+T %	G+C %	A+T/G+C
SS_01	61,7	38,2	1,61518324
SS_02	62,0	38,1	1,62729658
SS_03	61,8	38,2	1,61780104
SS_04	61,8	38,2	1,61780104
SS_05	61,7	38,2	1,61518324
SS_06	61,8	38,2	1,61780104
SS_07	62,0	38,1	1,62729658
SS_08	61,8	38,2	1,61780104
SS_09	61,8	38,2	1,61780104
SS_10	61,8	38,2	1,61780104

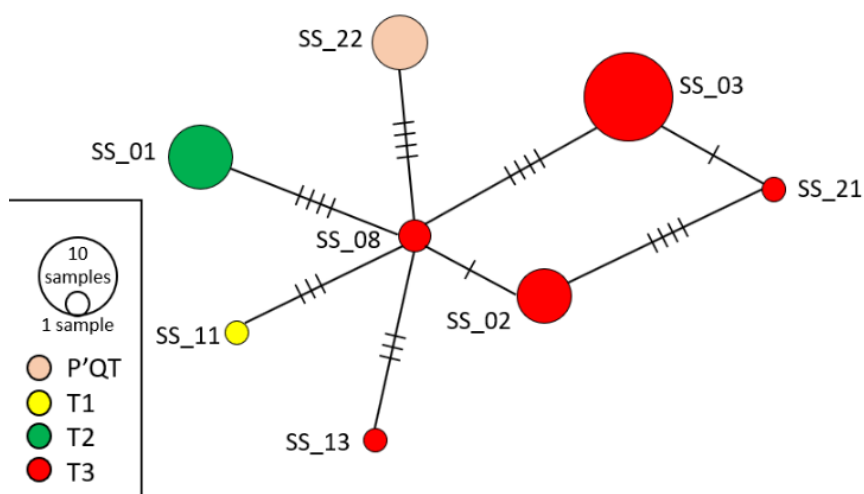
Nume probe	A+T %	G+C %	A+T/G+C
SS_11	61,7	38,3	1,61096605
SS_12	61,8	38,2	1,61780104
SS_13	62,0	38,1	1,62729658
SS_14	61,8	38,2	1,61780104
SS_15	62,0	38,1	1,62729658
SS_16	62,0	38,1	1,62729658
SS_17	61,8	38,2	1,61780104
SS_18	61,7	38,2	1,61518324
SS_19	61,7	28,2	1,61518324
SS_20	61,8	38,2	1,61780104
SS_21	62,0	38,1	1,62729658
SS_22	61,6	38,4	1,60416666
SS_23	61,8	38,2	1,61780104
SS_24	61,8	38,2	1,61780104
SS_25	61,6	38,4	1,60416666
SS_26	61,6	38,4	1,60416666
SS_28	61,7	38,2	1,61518324
SS_29	61,8	38,2	1,61780104
SS_30	61,6	38,4	1,60416666
SS_31	61,8	38,2	1,61780104
SS_33	61,7	38,2	1,61518324
SS_34	61,6	38,4	1,60416666

Se pot distinge două tipuri de ADN, dacă ne raportăm la bazele azotate cu cea mai mare frecvență, respectiv ADN de tip AT, (când $A+T > C+G$) și ADN de tip GC (când $A+T < C+G$). În cazul secvențelor nucleotidice ale citocromului b se poate observa că predomină bazele azotate A și T, prin urmare, toți indivizii analizați au caracteristic ADN-ul de tip AT ($A+T > C+G$). Aceeași concluzie se remarcă și în cazul secvențelor nucleotidice ale regiunii de control mitocondrial d-loop. Coeficientul de specificitate pentru cele două secvențe nucleotidice concatenate are o valoare medie de 1,45953823. Se poate constata faptul că valoarea obținută se încadrează în intervalul de valori specifice organismelor animale, cum este și cazul populației de bovine din rasa Sură de Stepă, analizată în acest studiu.

6.3.4. Rețeaua de haplotipuri rezultată în urma analizei secvențelor genice ale citocromului b și d-loop

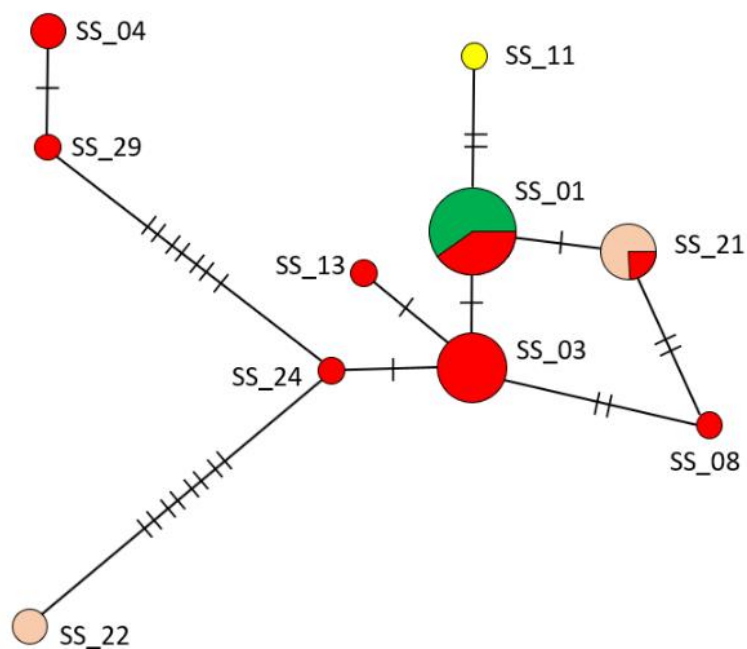
Prin analiza secvențelor nucleotidice pe baza programului Network a rezultat rețeaua de haplotipuri reprezentată grafic în figurile 6.23 a și b. Au fost identificate un număr de 4 mari haplotipuri (T1, T2, T3 și P'QT), cu rețele de conectare specifice. Fiecărui haplotip îi corespunde un anumit număr de indivizi (Tabelul 6.14.).

D-loop



a

Cyt B



b

Figura 6.23. Rețeaua de haplotipuri a indivizilor din populația de bovine Sură de Stepă
a. citocrom b; **b.** d-loop

Figure 6.23. The network haplotypes of Grey Steppe cattle population **a.** cytochrome b; **b.** d-loop

Prin analiza distribuției celor 4 haplotipuri s-a constatat faptul că haplotipul T3 are cea mai mare pondere, fiind identificat pentru un număr de 20 indivizi din totalul de 32 care au fost analizați.

Tabelul 6.14 / Table 6.14

Haplotipurile identificate și indivizii reprezentanți pentru fiecare haplotip la rasa Sură de Stepă
Identified haplotypes and representative individuals for each haplotype

Haplotipuri identificate	Indivizii reprezentanți	Total indivizi/haplotip
T3/T4	SS_02; SS_03; SS_04; SS_06; SS_07; SS_08; SS_09; SS_10; SS_12; SS_13; SS_14; SS_15; SS_16; SS_17; SS_20; SS_21; SS_23; SS_24; SS_29; SS_31	20
T2	SS_01; SS_05; SS_18; SS_19; SS_28; SS_33	6
T1	SS_11	1
P'QT	SS_22; SS_25; SS_26; SS_30; SS_34	5

Prin numeroasele studii ale ADNmt la specia *Bovinae*, s-au identificat un număr de 5 haplotipuri majore, specifice genului *Bos taurus*, strămoșul sălbatic al vitelor domestice (T1, T2, T3, T4) și respectiv 2 haplotipuri pentru *Bos indicus* (I1 și I2).

Cercetările recente au demonstrat faptul că aproape toate taurinele aparțin macro-haplogrupului T iar timpul de divergență estimat fiind de ~ 16 mii de ani, timp care indică un blocaj îngust în istoria evolutivă a taurinelor din *Bos taurus*. Macro-haplogrupul T este divizat în 2 subclade surori (T5 și T1/T2/T3), subclada predominantă fiind reprezentată de T1/T2/T3. De-a lungul timpului, T4 s-a dovedit a fi integrat în T3.

Un alt haplogrup, P, a fost identificat prin analiza regiunii de control mitocondrial d-loop, a taurinelor din nordul și centrul Europei.

Un alt studiu, având ca scop analiza secvențelor nucleotidice ale d-loop, specifice unei rase de taurine din Italia, aflată pe cale de dispariție, a condus la identificarea unui alt haplogrup de apartenență a acestei rase, respectiv haplogrupul Q. Același haplogrup Q, a fost identificat și în urma analizei filogenetice a bovinelor ancestrale europene, cu descendență în *Bos taurus primigenius*.

Un studiu realizat de Achilli et al. (2009), cu privire la originea taurinelor pe baza analizei genomului mitocondrial, a demonstrat faptul că nu toate taurinele din Europa aparțin haplogrupului T. Autorul a analizat secvențe genice ale ADNmt pentru un număr de 26 rase de bovine europene (22 din Italia și 4 din alte regiuni ale Europei). Majoritatea raselor s-au încadrat în haplogrupul T și subcladele sale. Un procent de 1,4% din rasele analizate a fost reprezentativ pentru haplogrupurile P și Q, specifice bovinelor ancestrale din nordul și centrul Europei, având ca strămoș comun *Bos taurus primigenius*.

Haplogrupul Q este apropiat din punct de vedere filogenetic cu haplogrupul T. Prezența exclusivă a haplogrupului Q în Europa, ar putea indica faptul că acesta a derivat din *Bos taurus primigenius*, cum este și cazul haplogrupurilor P și R. Studiile arată că haplogrupul Q și subcladele haplogrupului T sunt implicate în același eveniment de domesticire în Cornul abundenței, aspect despre care s-a discutat în prima parte a tezei (Figura 6.24).

Același studiu elaborat de Achilli arată faptul că majoritatea raselor de bovine italiene aparțin haplogrupului R. Prin urmare, rasele domesticite de taurine aparțin cel puțin a două haplogrupuri (R și P), specifice taurinelor ancestrale europene. Haplogrupul P sugerează apartenența unor rase domesticite în Orinetul Apropiat, odată cu migrația oamenilor.

Un alt articol recent, elaborat de Senczuk et al. (2021), vine cu o serie de completări la originea și istoria evolutivă a raselor de bovine podolice. Haplogrupul P este caracteristic taurinelor ancestrale din centrul și nordul Europei și unui mic număr de taurine din rasele moderne. Pe linia haplogrupului Q se disting rase de bovine italiene, egiptene și neolitice, europene iar pe linia R, rase de bovine italiene din grupul podolian grey.

În comparație cu rasele de bovine moderne, europene, bovinele din grupul "*Podolian Grey*", unde se încadrează și rasa Sură de Stepă care face subiectul acestei cercetări, prezintă multe caracteristici ancestrale (coarne lungi, longevitate, adaptabilitate la condițiile climatice și de mediu).

Istoria evolutivă a taurinelor europene este dominată de evenimente de introgresiune atât cu bovine ancestrale cât și cu alte rase. Conform celor mai recente descoperiri, introgresiunea dintre taurinele indicine și cele europene datează de ~ 4200 de ani.

Identificarea haplogrupului P'QT în urma analizei secvențelor nucleotidice ale rasei de bovine Sură de Stepă, indică faptul că acest haplogrup este de tip ancestral, fiind specific pentru *Bos taurus primigenius*, din care a evoluat această rasă de bovine.

În cadrul acestui haplogrup au fost identificați un număr de 5 indivizi (SS_22; SS_25; SS_26; SS_30; SS_34), reprezentând un procent de 16% din totalul exemplarelor analizate.

Distanța genetică dintre haplotipurile T1, T2 și T3 variază între 1 și 4 situsuri. Prezența haplotipurilor derivate din T sugerează o expansiune demografică a acestei populații.

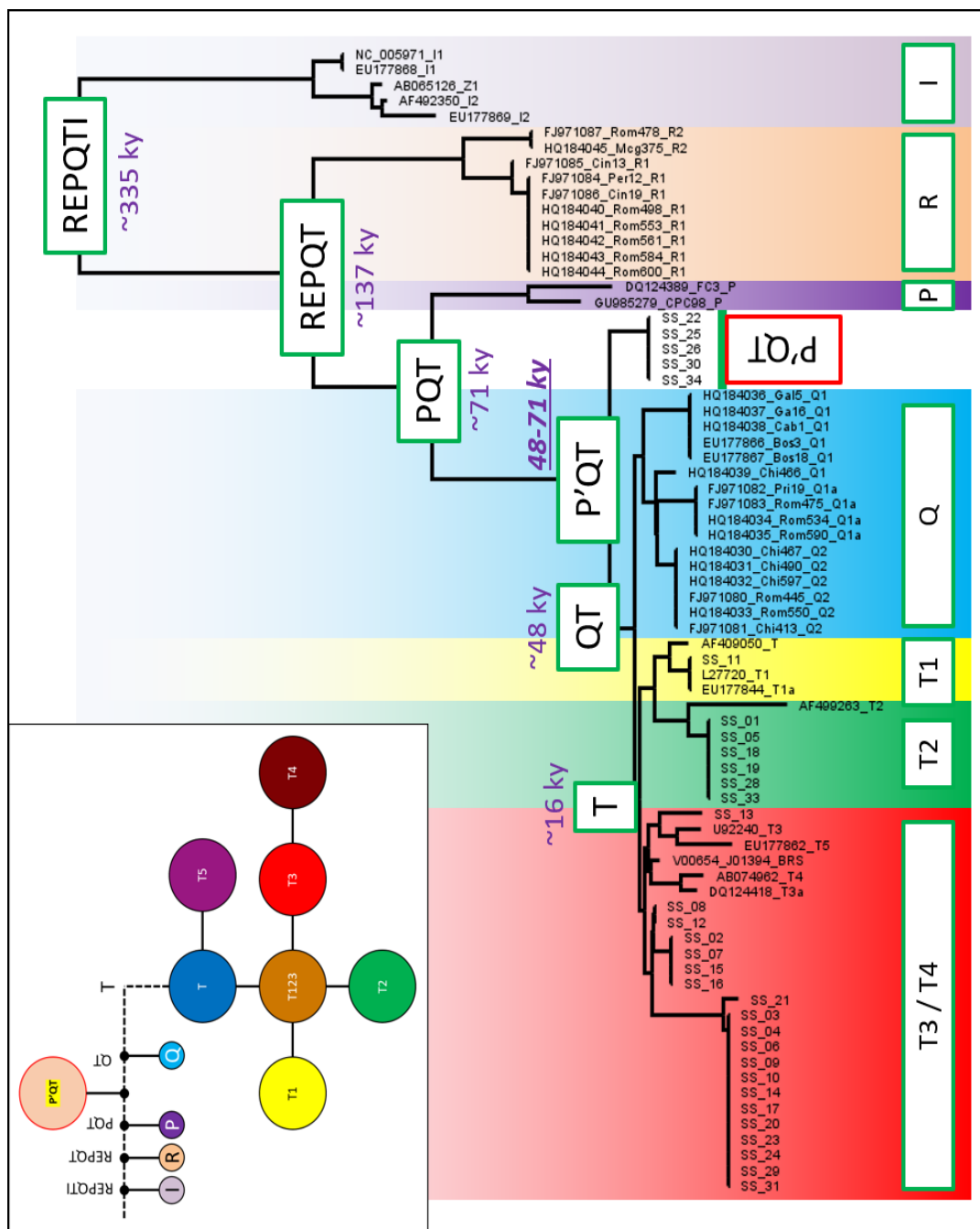


Figura 6.24. Arborele filogenetic obținut pe baza analizei genei citocrom b și estimarea timpului de divergență din cadrul populației de bovine Sură de Stepă
Figure 6.24. Phylogenetic tree obtained from cytochrome b gene analysis and estimation of time divergence

O concluzie principală ar fi aceea că există un grad mare de variabilitate genetică a efectivului din populația de bovine din rasa Sură de Stepă din România, datorită unor procese mutaționale care fac diferență între indivizi.

Rezultatele acestei cercetări, pot contribui la îmbunătățirea programului de conservare al acestei rase și a informațiilor actuale cu privire la diversitatea genetică a populației, reprezentând un instrument valoros pentru eforturile privind conservarea acestui rezervor de gene aflat în pericol de extincție.

6.3.5. Dinamica ratei de evoluție a markerilor mitocondriali studiați

Au fost analizate două seturi de date, respectiv secvențe nucleotidice ale citocromului b și ale regiunii de control mitocondrial d-loop. Pentru fiecare bloc de alinieri ale secvențelor genice a fost calculat modelul optim de substituție pe baza programului JmodelTest (Darriba et al., 2012).

În tabelele 6.15 și 6.16 pot fi consultate rezultatele obținute cu privire la modelul optim de substituție.

Cele 32 secvențe ale genei citocrom b pentru indivizii studiați au fost aliniate în bloc, lungimea totală a acestora fiind de 1140 pb. În urma analizei a fost observat un număr de 22 situsuri variabile (1,9%) din care 18 situsuri informative (1,6%).

În cazul secvențelor d-loop, numărul de situsuri variabile a fost 18 (2,0%) iar numărul de situsuri informative a fost 13 (1,4%).

Tabelul 6.15 / Table 6.15

Modelul optim de substituție calculat în programul JModelTest (citocrom b și d_loop)
The optimal substitution model calculated in the JModelTest program (cytochrome b and d_loop)

	Cyt_b			D-loop		
<i>Model</i>	TrN+I			TPM3uf		
<i>Partition</i>	010020			012012		
<i>-lnL</i>	1708.1951			1354.6687		
<i>K</i>	64			67		
<i>freqA</i>	0.3125	R(a)	1.0000	0.3278	R(a)	23.9836
<i>freqC</i>	0.3021	R(b)	4.4591	0.2440	R(b)	200.0000
<i>freqG</i>	0.1352	R(c)	1.0000	0.1379	R(c)	0.0586
<i>freqT</i>	0.2501	R(d)	1.0000	0.2902	R(d)	23.9836
<i>ti/tv</i>	-	R(e)	0.5005	-	R(e)	200.0000
	-	R(f)	1.0000	-	R(f)	0.0586
<i>p-inv</i>	0.8680	gamma	-		gamma	-

Tabelul 6.16 / Table 6.16

Numărul de situsuri și raportul Tr/Tv pentru secvențele genice studiate
Number of sites and Tr/Tv ratio for the studied gene sequences

Rasa	Secvența	Nr. situsuri informative	%	Nr. situsuri variabile	%	Tr/Tv
Sură de Stepă	Cyt B	18	1,6	22	1,9	0,755
	D-loop	13	1,4	18	2,0	5,107

În ceea ce privește valorile rezultate pentru frecvențele bazelor azotate, acestea variază între 31,2% pentru A, 25,1% pentru T, 13,4% pentru G și 30,2% pentru C (secvența citocrom b). Transversiile de tip A<->G și T<->C au valori de 4,4591 respectiv 0,5005 (Figura 6.25.a), raportul acestora fiind de 0,755 (Tabelul 6.16.).

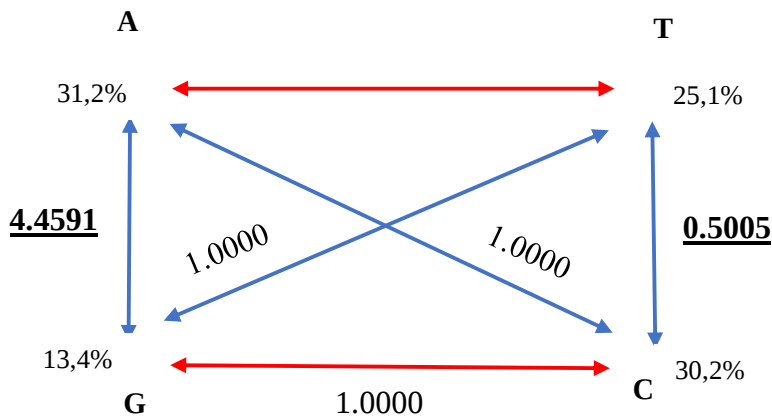


Figura 6.25.a. Ratele de substituție pentru fiecare nucleotidă, calculate în jModelTest pentru un set de 32 secvențe ale genei citocrom b provenite de la indivizi aparținând rasei de bovine Sură de Stepă

Figure 6.25.a. Substitution rates for each nucleotide, calculated in jModelTest for a set of 32 cytochrome b gene sequences, Grey Steppe Steppe cattle breed

Modelul de evoluție al genei pentru indivizii analizați a fost TrN+J pentru citocrom b și TPM3uf pentru d-loop (Tabelul 6.15).

Frecvențele bazelor azotate au fost următoarele: 32,8% A, 29,0% T, 24,3% C și 13,9% G. Raportul Tr/Tv a prezentat o valoare de 5,107 (Tabelul 6.15. și Figura 6.25.b).

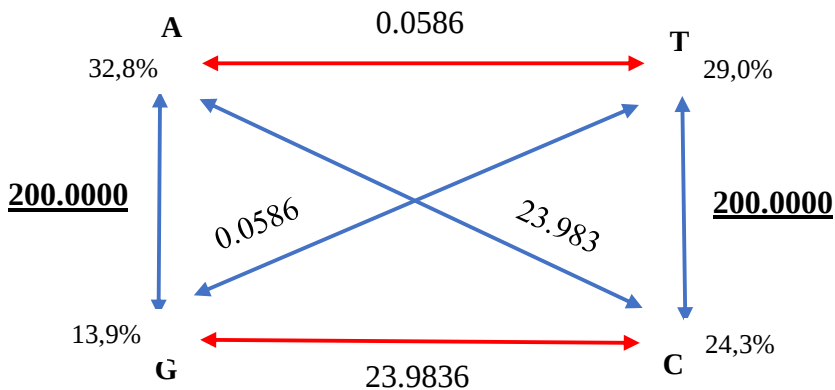


Figura 6.25.b. Ratele de substituție pentru fiecare nucleotidă, calculate în jModelTest pentru un set de 32 secvențe ale genei d-loop provenite de la indivizi aparținând rasei de bovine Sură de Stepă

Figure 6.25.b. Substitution rates for each nucleotide, calculated in jModelTest for a set of 32 d-loop gene sequences, Grey Steppe Steppe cattle breed

Pentru a estima relațiile din cadrul populației de bovine, pe baza analizei secvențelor nucleotidice ale citocromului b și ale regiunii de control mitocondrial d-loop, au fost realizați arborii filogenetici, cu ajutorul programului SeaView, reprezentați în figurile 6.26 (pentru citocrom b) și 6.27 (pentru d-loop).

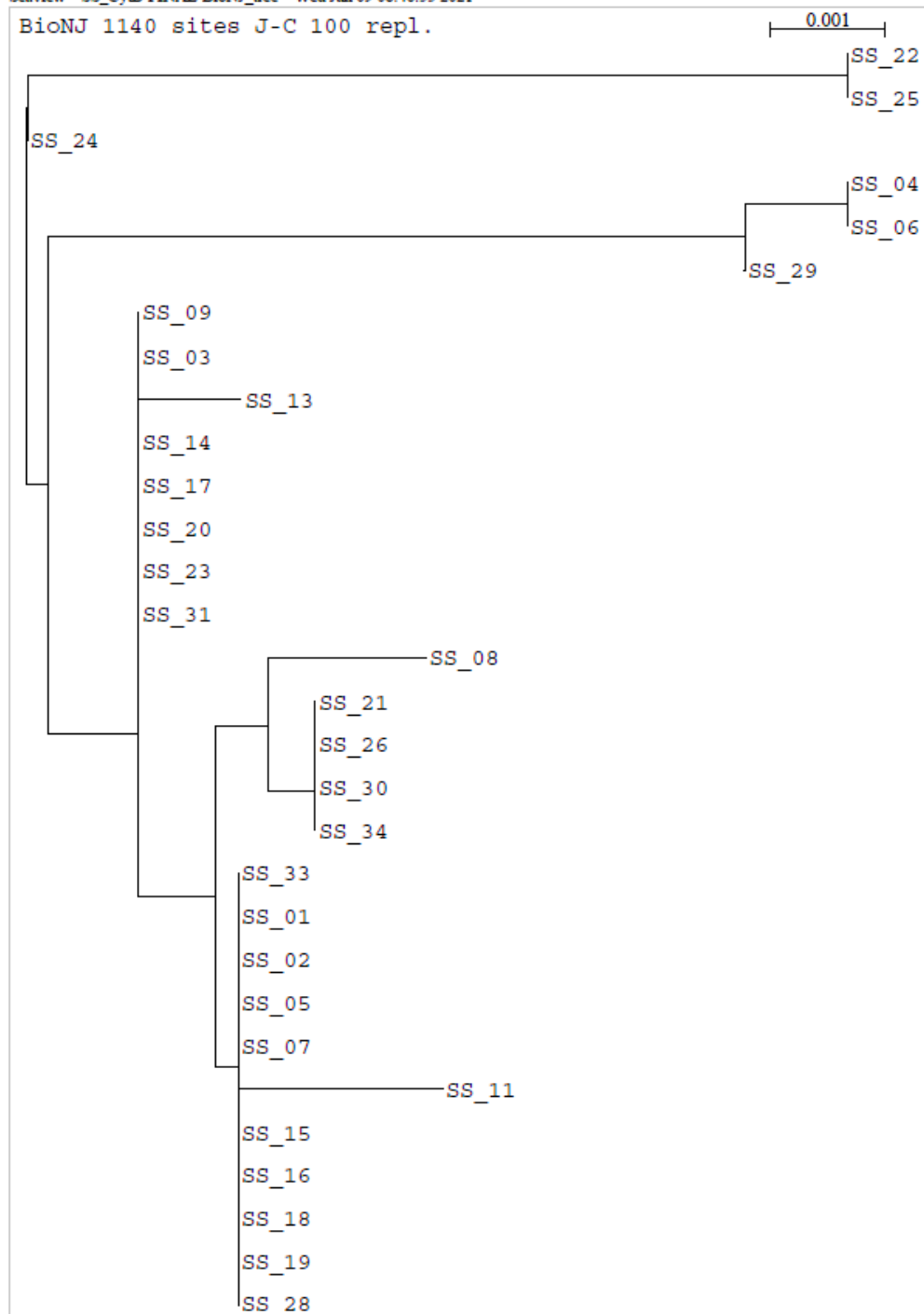


Figura 6.26. Arbore filogenetic realizat pe baza analizei secvențelor genice ale citocromului b, pentru populația de bovine Sură de Stepă

Figure 6.26. Phylogenetic tree based on cytochrome b gene sequence analysis for the Grey Steppe population

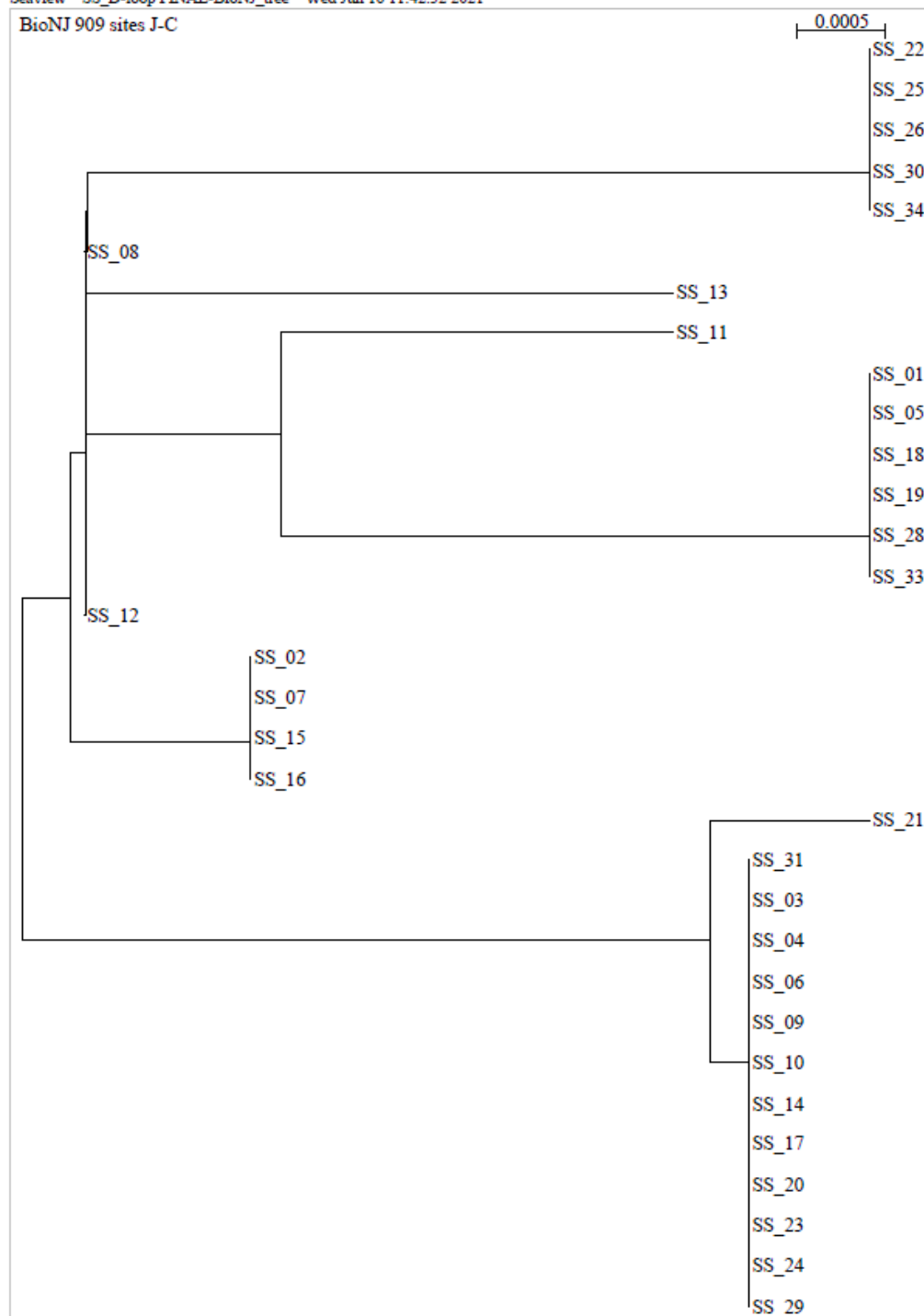


Figura 6.27. Arbore filogenic realizat pe baza analizei secvențelor genice ale d-loop, pentru populația de bovine Sură de Stepă

Figure 6.27. Phylogenetic tree based on d-loop gene sequence analysis for the Grey Steppe population

6.3.6. Expansiunea demografică și spațială a populației de bovine din rasa Sură de Stepă

Expansiunea demografică și spațială are la bază modelul de calcul *Mismatch distribution* și arată distribuția numărului de diferențe identificate între perechile de haplotipuri. De regulă, această distribuție poate fi unimodală (specifică populațiilor care au suferit fie o expansiune demografică recentă, fie o expansiune spațială caracterizată de un grad mare de migrație) sau multimodală (în cazul populațiilor aflate în echilibru demografic).

În cazul populației de bovine Sură de Stepă a rezultat o distribuție multimodală atât în urma analizei secvențelor nucleotidice ale citocromului b cât și a regiunii de control mitocondrial d-loop (Figura 6.28 a și b).

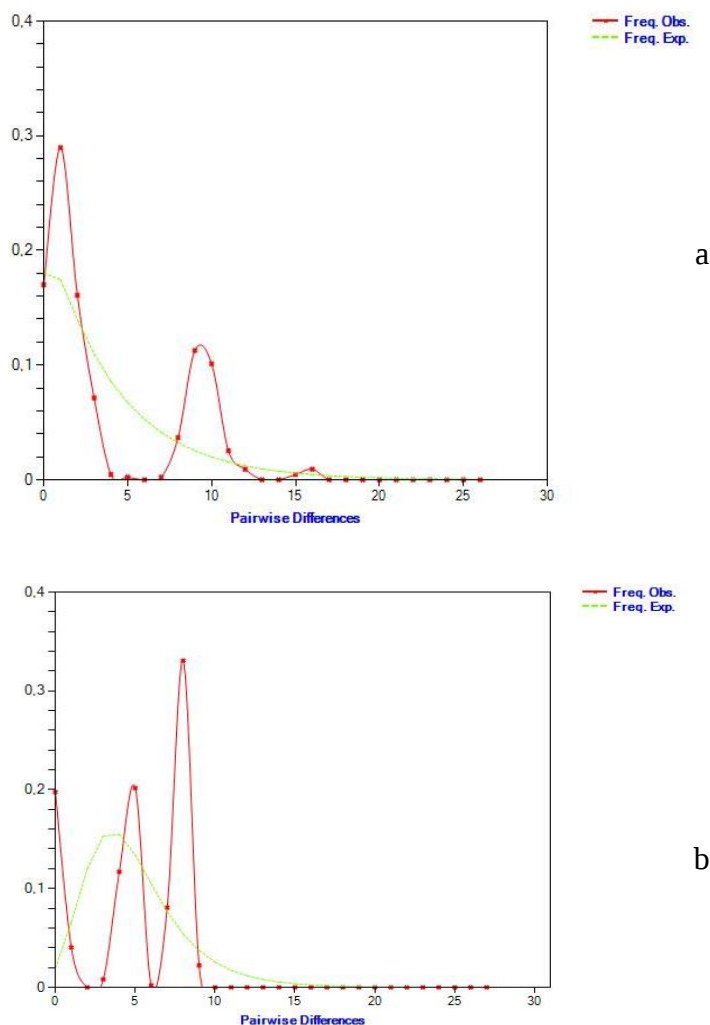


Figura 6.28. Expansiunea demografică pentru populația Sură de Stepă, **a.** citocrom b; **b.** d-loop
Figure 6.28. Demographic expansion for Grey Steppe population, **a.** cytochrome b; **b.** d-loop

Interpretarea datelor obținute arată o distribuție asimetrică a valorilor, prin urmare populația studiată se află într-un echilibru demografic. Cele două grafice obținute prin analiza Mismatch distribution arată atât diferențele observate cât și cele așteptate.

Analiza dezechilibrului linkage - LD

Termenul de *linkage* în analiza geneticii populaționale, sugerează lipsa fenomenului de independență între doi loci. Explicația fenomenului de linkage arată că doi loci, A/B se situează pe același cromozom, foarte aproape unul de celălalt. Așadar, alelele specifice celor doi loci se moștenesc ca un întreg. În cazul în care locii sunt situați pe cromozomi distincți, sau chiar pe același cromozom, însă între ei există o distanță destul de mare, nu se poate discuta despre un „linkage perfect”, aspect care duce la separarea acestora prin procesul de recombinare (Mackay și Powell, 2007).

Dezechilibrul linkage LD, semnifică o asociere de ordin non-aleator a alelelor pentru unul sau mai mulți loci, fiind afectat de o serie de factori fie genetici, fie non-genetici (driftul genetic, procesul de selecție, procesul de recombinare, gene-flow sau fluxul de gene) (Slatkin, 2008).

Pentru populația din rasa Sură de Stepă, a fost calculat LD-Dezechilibrul linkage pentru cei doi markeri (citocrom b și d-loop) (Figurile 6.29 a și b).

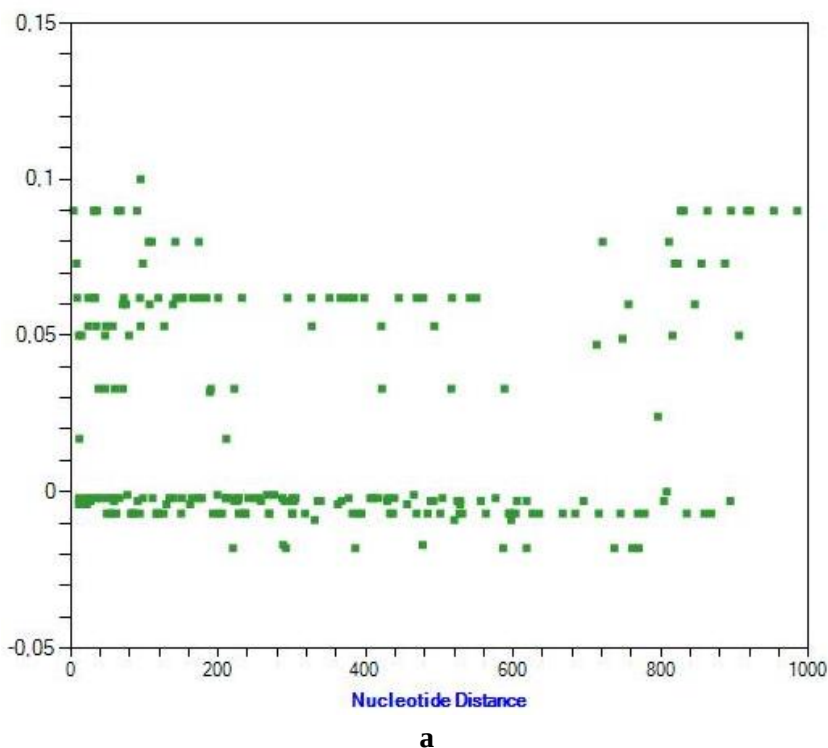
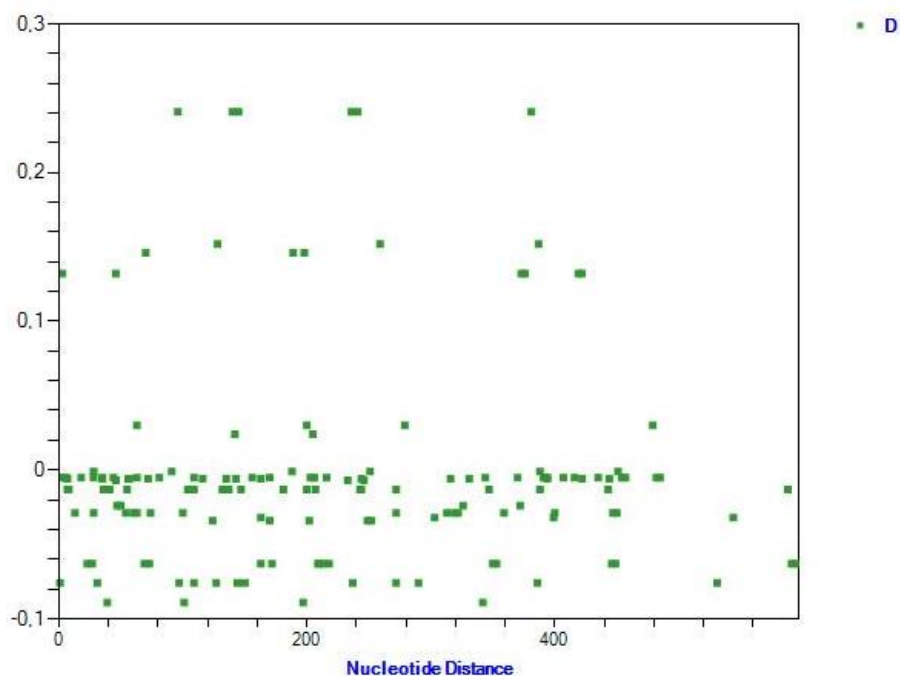


Figura 6.29 a. Distanța între nucleotide (citocrom b, Sură de Stepă)

Figure 6.29 a. Nucleotide distance (cytochrome b, Grey Steppe)



b

Figura 6.29.b. Distanța între nucleotide (d-loop, Sură de Stepă)

Figure 6.29.b. Nucleotide distance (d-loop, Grey Steppe)

În urma interpretării rezultatelor, s-a remarcat o probabilitate semnificativă ($0,01 < p < 0,05$), ca dezechilibrul linkage să existe în cadrul populației analizate

Acest rezultat reprezintă un instrument important în analiza diversității genetice dar și în programele de conservare a rasei.

CAPITOLUL 7
CUANTIFICAREA GRADULUI DE DIVERSITATE GENETICĂ A
INDIVIZILOR DIN RASA DE BOVINE PINZGAU
CHAPTER 7
QUANTIFICATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF PINZGAU
CATTLE BREED

Analiza diversității genetice a rasei de bovine Pinzgau, la fel ca și în cazul rasei Sură de Stepă a constat în parcurgerea mai multor etape de cercetare, respectiv izolarea și purificarea probelor de ADN, amplificarea genei citocrom b și a regiunii de control mitocondrial d-loop prin tehnica PCR, utilizând primeri specifici, validarea ampliconilor prin electroforeză în gel de agaroză și în final analiza secvențelor genice și interpretarea datelor.

7.1. Cuantificarea ADN-ului total și amplificarea secvențelor genice citocrom b și d-loop

Acest subcapitol prezintă rezultate cu privire la concentrația și gradul de puritate al probelor de ADN izolate de la cei 24 indivizi din rasa Pinzgau, amplificarea secvențelor genice de interes și validarea rezultatelor amplificării prin electroforeză în gel de agaroză cu scopul de a vedea specificitatea primerilor utilizați și dimensiunea fragmentelor analizate.

7.1.1. Cuantificarea ADN-ului total

Cuantificarea probelor de ADN aparținând celor 24 femele bovine au variat în intervalul 4,1-61,9 ng/μl, media fiind de 27,7 ng/ μl (Tabelul 7.1 și Figura 7.1) iar raportul celor două absorbții, respectiv A260/A280, a prezentat valori cuprinse în intervalul 0,68 - 2,13, cu o medie de 1,68.

Tabelul 7.1 / Table 7.1

Cuantificarea spectrofotometrică a ADN-ului total extras din probe de sânge, rasa de bovine Pinzgau
Spectrophotometric quantification of total DNA extracted from blood samples, Pinzgau cattle breed

ID Probă	Abs260	Abs280	Abs230	260/280	260/230	Concentrația ADN (ng/μl)	Tipul probei
P_01	0,352	0,218	0,375	1,61	0,94	17,6	dsDNA
P_02	0,447	0,289	0,480	1,55	0,93	22,3	dsDNA
P_03	1,24	0,842	1,212	1,47	1,02	61,9	dsDNA
P_04	0,369	0,230	0,339	1,60	1,09	18,4	dsDNA
P_05	0,486	0,305	0,430	1,59	1,13	24,3	dsDNA
P_06	0,844	0,500	0,661	1,69	1,28	42,2	dsDNA
P_07	0,371	0,218	0,382	1,70	0,97	18,5	dsDNA
P_08	0,385	0,227	0,373	1,70	1,03	19,2	dsDNA
P_09	0,589	0,369	0,627	1,60	0,94	29,4	dsDNA
P_10	0,796	0,506	1,024	1,57	0,78	39,7	dsDNA
P_11	0,404	0,266	0,409	1,52	0,99	20,2	dsDNA
P_12	0,603	0,377	0,800	1,60	0,75	30,1	dsDNA
P_13	0,821	0,488	0,559	1,68	1,47	41,0	dsDNA
P_14	0,922	0,526	0,579	1,75	1,59	46,0	dsDNA
P_15	0,959	0,570	0,666	1,68	1,44	47,9	dsDNA
P_16	0,547	0,315	0,486	1,74	1,13	27,3	dsDNA
P_17	0,347	0,168	0,311	2,07	1,12	17,3	dsDNA
P_18	0,355	0,171	0,301	2,08	1,18	17,7	dsDNA
P_19	0,262	0,147	0,241	1,78	1,09	13,0	dsDNA
P_20	0,084	0,123	0,280	0,68	0,30	4,10	dsDNA
P_21	0,306	0,169	0,400	1,81	0,76	15,2	dsDNA
P_22	0,398	0,187	0,226	2,13	1,76	19,9	dsDNA
P_23	0,627	0,299	0,557	2,10	1,13	31,3	dsDNA
P_24	0,806	0,468	0,826	1,72	0,98	40,3	dsDNA

În graficul 7.1 sunt reprezentate valorile concentrației ADN-ului care s-au situat în intervalul 4,1-61,9 ng/μl.

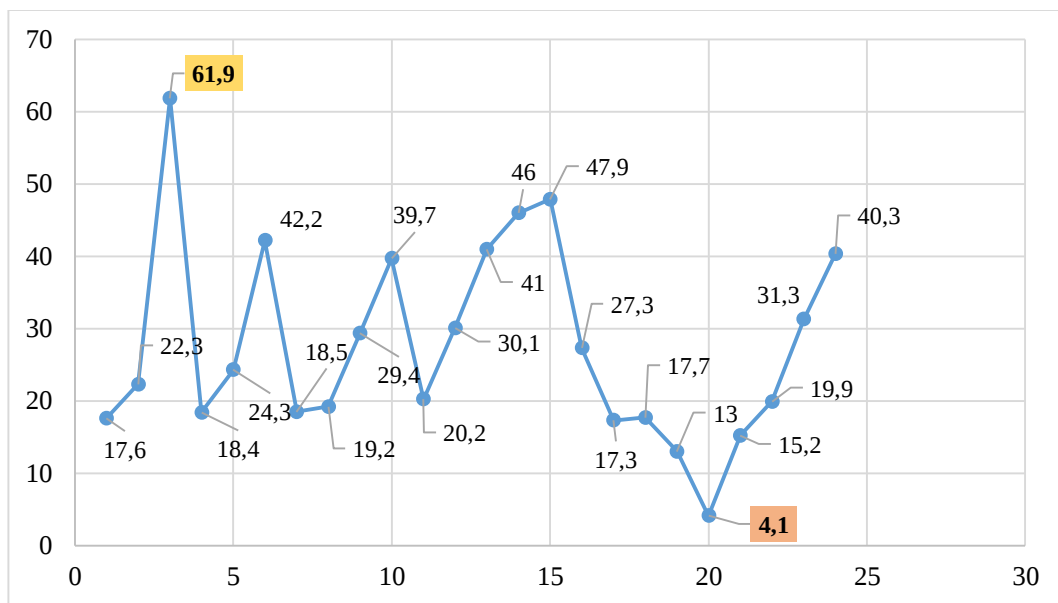


Figura 7.1. Valorile concentrației ADN-ului extras, măsurate cu spectrofotometrul Nanodrop ASP-3700 (ng/μl) – rasa Pinzgau

Figure 7.1. Extracted DNA concentration values, measured with Nanodrop ASP-3700 spectrophotometer (ng/μl) - Pinzgau cattle breed

O comparație între valorile minimă și maximă, respectiv valoarea medie a datelor obținute cu privire la concentrația ADN-ului cuantificat se poate observa în graficul 7.2.

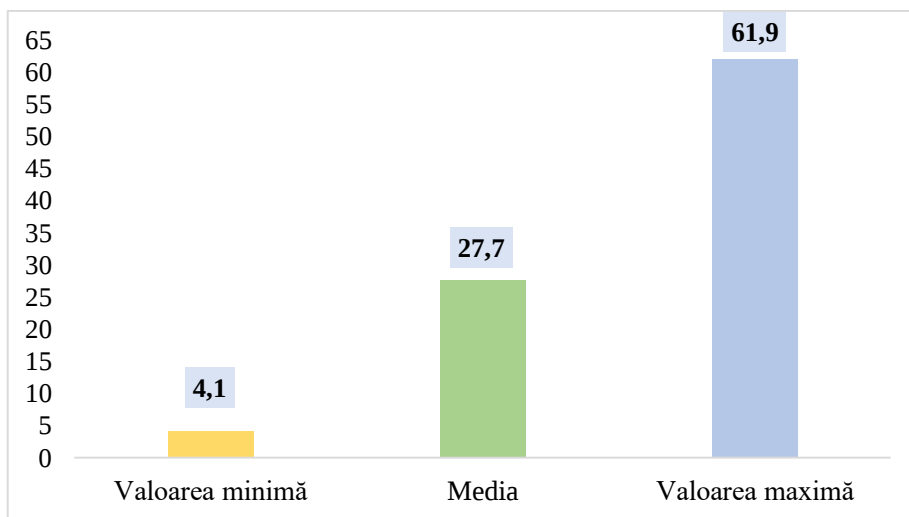


Figura 7.2. Comparație între valoarea medie a concentrației ADN-ului, în raport cu valorile minimă/maximă (ng/μl)

Figure 7.2. Comparison between the average value of the DNA concentration, in relation to the minimum / maximum values (ng/μl)

Rezultatele obținute în urma analizei de cuantificare au demonstrat eficacitatea metodei de extracție a ADN-ului.

Un alt aspect important în analizele de genetică moleculară se referă la puritatea ADN-ului extras care se evaluează pe baza raportului absorbanțelor A260/A280. Valorile care se obțin sunt clasificate, de regulă, în 3 intervale (<1,7; 1,7-2,0; >2,0).

Distribuția procentuală a celor 24 probe, în funcție de valoarea raportului absorbanțelor A260/A280 este reprezentată în graficul 7.3.

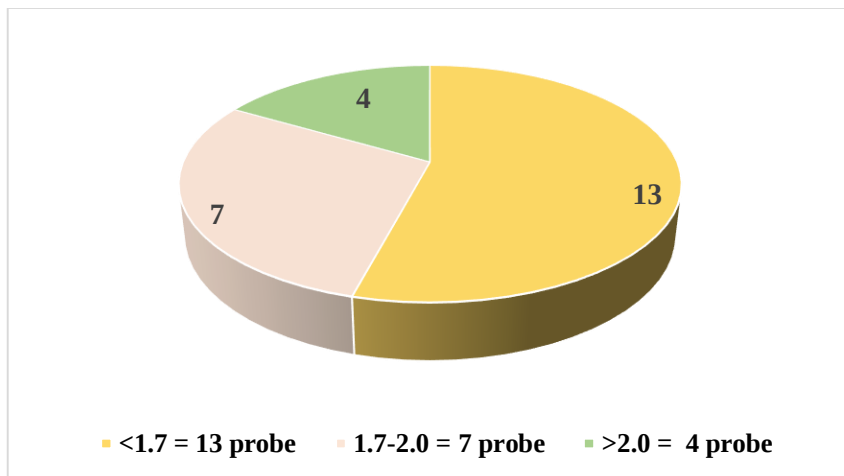


Figura 7.3. Distribuția procentuală a probelor în acord cu valoarea raportului absorbantelor A260/A280
Figure 7.3. Percentage distribution of samples according to the value of the absorbent ratio A260/A280

Din totalul de 24 probe, 13 au prezentat o valoare mai mică de 1,7, un număr de 7 probe au avut valori în intervalul 1,7-2,0 și 4 probe au avut valori mai mari de 2,0.

7.1.2. Amplificarea genică și validarea produșilor PCR prin tehnica de electroforeză în gel de agaroză

În cazul probelor de ADN ale rasei de bovine Pinzgau, pentru amplificarea celor două gene de interes, respectiv citocrom b și d-loop, s-au folosit aceleași perechi de primeri (BCYT-F/BCYT-R pentru citocrom b și BRS-F/RBIS-R pentru d-loop).

Programele PCR în cazul analizei rasei Pinzgau au fost aceleași ca și în cazul rasei Sură de Stepă, metodologia de cercetare fiind prezentată în subcapitolele anterioare unde sunt relatate rezultatele și discuțiile cu privire la analiza diversității genetice a rasei de bovine Sură de Stepă.

7.1.2.1. Amplificarea genică a citocromului b

ADN-ul izolat și purificat, a fost amplificat prin reacția de polimerizare în lanț, prin care s-a reușit o multiplicare exponențială a unor secvențe de material informațional, respectiv citocrom b și d_{loop}.

✚ Etapa I – amplificarea genei citocrom b, utilizând primerii BCYT-F ȘI BCYT-R

În figura 7.4. se poate consulta *Programul PCR* pentru reacția de amplificare a citocromului b, care s-a desfășurat într-un număr de 35 cicluri de amplificare. Tabelul 7.2. prezintă componentele mediului de reacție.

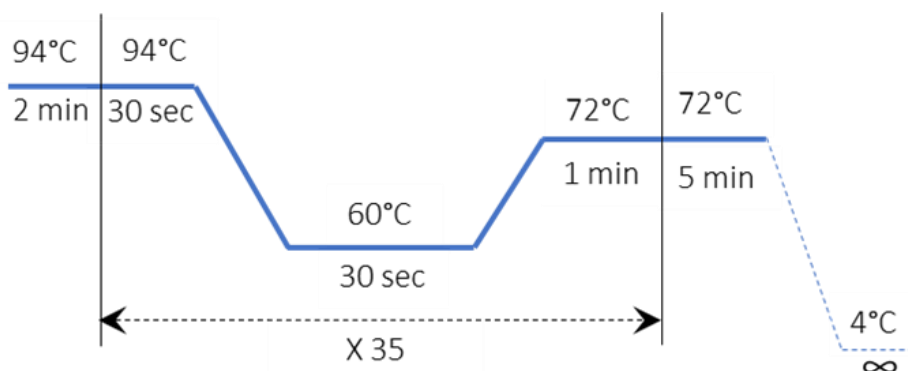


Figura 7.4. Programul PCR_Pinzgau, amplificare citocrom b
Figure 7.4. PCR Program_Pinzgau, chytochrome b amplification

Tabelul 7.2 / Table 7.2

Componentele mediului de reacție necesare pentru PCR, amplificare citocrom b, (probele P-01...P-24)
The PCR reaction mix, amplification chytochrome b (samples P-01 ... P-24)

Mix de reacție (GoTaq® Green Master mix)	Cantitate	x 25 => Volum final
MMix	12,5	625
MgCl ₂	1	25
Bcyt-F	2	50
Bcyt-R	2	50
H ₂ O	15	375
ADN	2 µL	23 µL

Mixul de reacție a fost preparat într-un tub steril, Eppendorf (2 ml), în care s-au adăugat toate componentele prezentate în tabelul 4.3., luând în calcul cantitățile necesare, raportate la numărul de probe, plus controlul negativ C-.

7.1.2.2. Amplificarea genică a regiunii de control mitocondrial d-loop

✚ Etapa II–amplificarea secvenței d-loop utilizând primerii BRS-F, RBIS-R

Componentele mediului de reacție pot fi identificate în tabelul 7.3 iar în figura 7.5 se poate observa programul PCR cu parametrii specifici de amplificare, reacție desfășurată într-un număr de 35 cicluri.

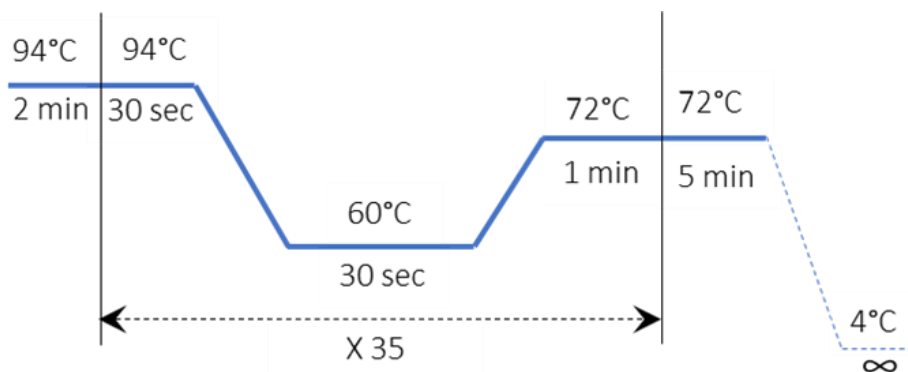


Figura 7.5. Programul PCR_Pinzgau, amplificare d-loop
Figure 7.5. PCR Program_Pinzgau, d-loop amplification

Tabelul 7.3 / Table 7.3

Componentele mediului de reacție necesare pentru PCR, amplificare d-loop, (probele P-01...P-24)

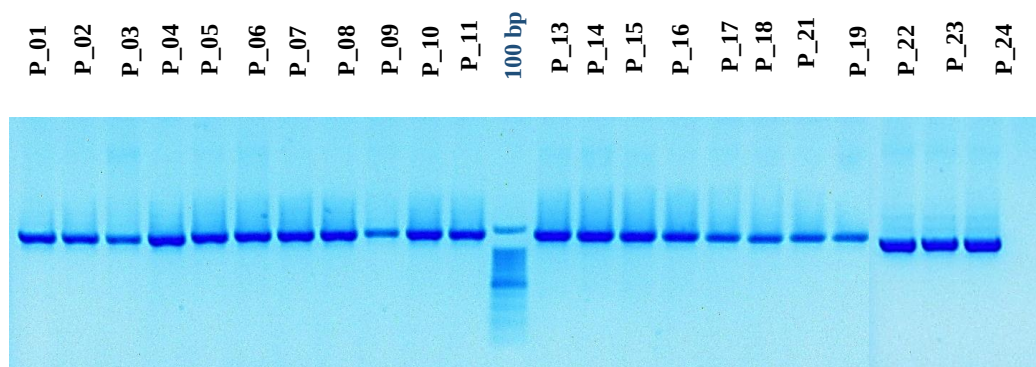
The PCR reaction mix, amplification d-loop (samples P-01 ... P-24)

Mix de reacție (GoTaq® Green Master mix)	Cantitate	x 25 => Volum final
MMix	12,5	625
MgCl ₂	1	25
Bcyt-F	2	50
Bcyt-R	2	50
H ₂ O	15	375
ADN	2 μL	23 μL

7.1.2.3. Validarea produșilor PCR pentru citocrom b

Pentru a vedea gradul de puritate, dimensiunea moleculară sau eventualele contaminări nespecifice, ampliconii rezultați în urma amplificării secvențelor genice de interes au fost validați în gel de agaroză de concentrație 1%, prin migrare la o tensiune de 100 volți, într-un interval de 30 minute. Estimarea dimensiunii fragmentelor amplificate s-a realizat pe baza unui marker cu o greutate moleculară de 100 perechi de baze.

Imaginea gelului de electroforeză, după migrarea probelor sub acțiunea curentului electric, se poate vedea în figura 7.6.



70 V, 45 min, 1%, 21.12.2020

Figura 7.6. Electroforeza produșilor PCR pentru gena citocrom b la indivizii din rasa Pinzgau (probele P_01...P_24)

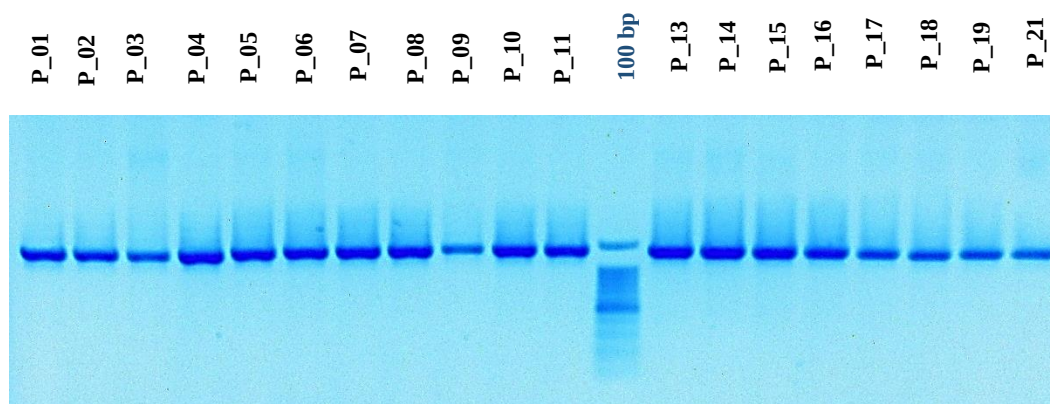
Figure 7.6. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons, cytochrome b (Pinzgau, P_01... P_24)

În urma validării electroforetice a ampliconilor s-a constatat că nu au existat amplificări nespecifice sau eventuale contaminări de altă natură iar primerii folosiți pentru amplificare (Bcyt-F și Bcyt-R) au prezentat un nivel mare de specificitate pentru secvența genică analizată, obținându-se un număr mare de copii.

7.1.2.4. Validarea produșilor PCR pentru regiunea de control mitocondrial d_loop

Ca urmare a migrării produșilor PCR în gel de agaroză, s-a constatat faptul că nu au rezultat eventuale amplificări nespecifice (Figura 7.7).

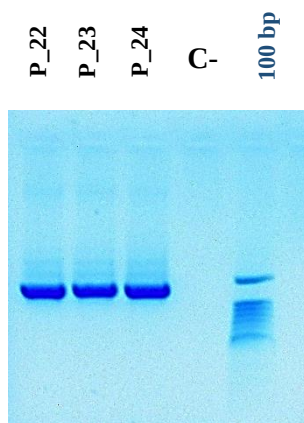
Cei doi primeri utilizați, forward (BRS-F) și reverse (RBIS-R) au prezentat specificitate ridicată pentru secvența genică analizată, d-loop. Imaginea gelului de electroforeză este redată în figurile 7.7 și 7.8.



70 V, 45 min, 1%, 21.12.2020

Figura 7.7. Electroforeza produşilor PCR pentru gena d-loop la indivizii din rasa Pinzgau (probele P_01...P_21)

Figure 7.7. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons, d-loop (Pinzgau, samples P_01... P_21)



70 V, 45 min, 1%, 21.12.2020

Figura 7.8. Electroforeza produşilor PCR pentru gena d-loop la indivizii din rasa Pinzgau (probele P_22...P_24)

Figure 7.8. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons, d-loop (Pinzgau,, samples P_22... P_24)

Atât în cazul rasei Sură de Stepă, cât şi al rasei Pinzgau secvenţele de ADNmt au fost amplificate cu succes, nu s-au identificat contaminanţi în probe iar primerii utilizaţi (Bcyt-F şi Bcyt-R pentru citocrom b şi BRS-F şi RBIS-R pentru d-loop) au prezentat specificitate ridicată.

7.2. Analiza brută a secvențelor nucleotidice la rasa Pinzgau

În cazul rasei Pinzgau, ca și în cazul rasei Sură de Stepă, s-a identificat frecvența haplotipurilor pentru cei 24 indivizi, atât pe baza analizei secvențelor genice ale citocromului b cât și a regiunii de control mitocondrial d-loop. De asemenea, s-a calculat proporția celor patru baze azotate pentru ambele secvențe precum și coeficientul de specificitate pe baza raportului A+T/G+C. S-a urmărit în ansamblu, dinamica ratei de evoluție a celor doi markeri mitocondriali și expansiunea demografică a grupului de indivizi analizați.

7.2.1. Evaluarea frecvenței haplotipurilor prin analiza secvențelor genice ale citocromului b și a regiunii de control mitocondrial d-loop

Ca urmare a analizei secvențelor genice, spre deosebire de rasa Sură de Stepă, în cazul rasei Pinzgau au fost identificate 3 haplotipuri, având frecvențe diferite (T1, T2 și T3). Cei 24 de indivizi au fost distribuiți în haplotipurile corespunzătoare, astfel: 18 indivizi aparținând haplotipului T3 (75%), 5 indivizi identificați în cadrul haplotipului T2 (21%) și un singur individ reprezentant pentru haplotipul T1 (4%) (Figura 7.9).

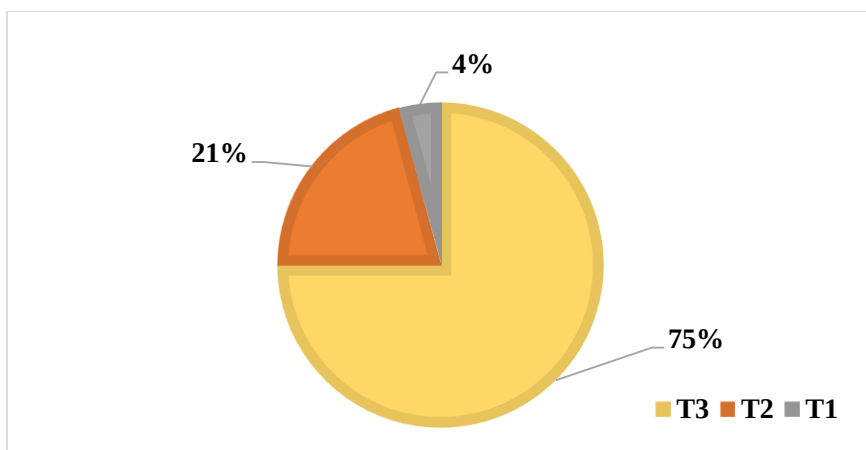


Figura 7.9. Frecvența haplotipurilor pentru indivizii din rasa Pinzgau analizați
Figure 7.9. Frequency of haplotypes for Pinzgau individuals

Încadrarea celor 24 femele din rasa Pinzgau în cadrul haplogrupului T și subcladele sale a fost următoarea: un număr de 18 indivizi, respectiv P_02; P_03; P_04; P_05; P_06; P_07; P_08; P_10; P_13; P_14; P_15; P_16; P_17; P_18; P_19; P_21; P_23 și P_24 au fost încadrați în haplotipul T3, indivizii cu numerele de identificare P_01; P_11; P_12; P_20 și P_21 s-au regăsit în haplotipul T2 iar un singur individ, respectiv P_09 a fost reprezentant pentru haplotipul T1.

Se constată faptul că haplotipul T3, în care se încadrează majoritatea taurinelor europene (Achilli, 2009) prezintă cea mai mare pondere (75%), acest lucru observându-se și în cazul analizei secvențelor specifice rasei Sură de Stepă, unde procentul pentru acest haplotip a fost de 62%.

7.2.2. Proporția bazelor azotate în secvențele nucleotidice pentru citocrom b și d-loop

În urma analizei frecvențelor celor 4 baze azotate, utilizând programul SeaView, pentru secvențele concatenate ale genei citocrom b s-au obținut procente de 30,5% A, 25,4% T, 29,9% C și 14,2% G iar pentru secvențele concatenate ale regiunii de control mitocondrial d-loop, au fost obținute valori procentuale de 32,6% A, 29,1% T, 24 % C și 13,8% G (Tabelul 7.4 și Figura 7.10).

Valorile sunt foarte apropiate de cele obținute în cazul analizei secvențelor specifice rasei Sură de Stepă, variind în limite foarte mici. Astfel, se constată un echilibru între cele patru baze azotate din punct de vedere proporțional.

Tabelul 7.4 / Table 7.4

Valorile frecvențelor bazelor azotate pentru secvențele P_citocrom b și P_d-loop
Nitrogen base frequency for P_cytochrome b and P_d-loop sequences

Secvența genică	Valori procentuale baze azotate			
	A %	T %	C %	G %
P-Cyt_B	30,5	25,4	29,9	14,2
P-D_loop	32,6	29,1	24,5	13,8

Figura 4.36 este o reprezentare grafică a frecvențelor bazelor azotate pentru ambele secvențe genice analizate din care se observă faptul că cele mai apropiate valori se regăsesc în cazul guaninei (14,2% pentru citocrom b și 13,8% pentru d-loop) iar cele mai mari diferențe procentuale se regăsesc în cazul citozinei (29,9% pentru citocrom b și 24,5% pentru d-loop).

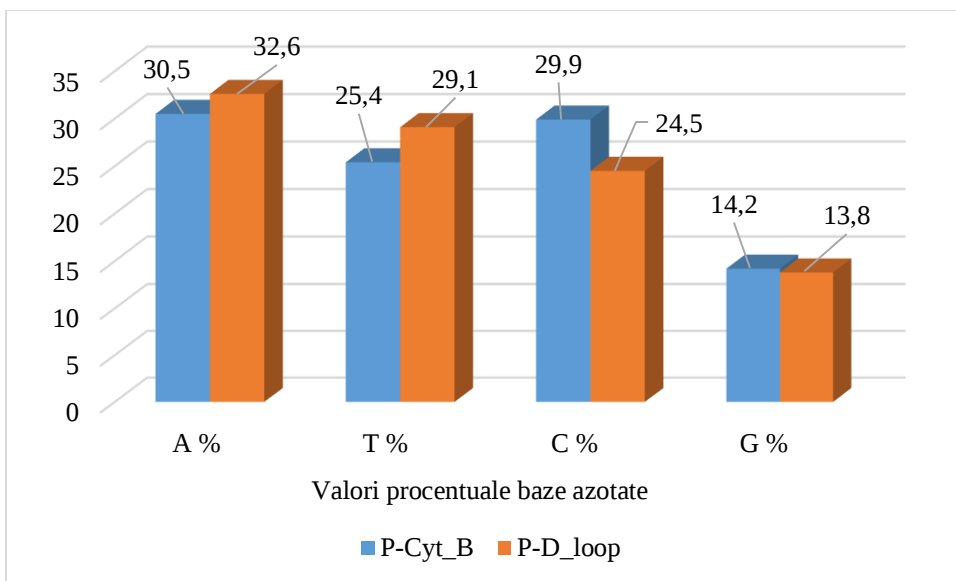


Figura 7.10. Reprezentarea valorilor frecvențelor bazelor azotate pentru secvențele P_citocrom b și P_d_loop

Figure 7.10. Representation of nitrogen base frequency values for P_cytochrome b and P_d_loop sequences

Cu scopul de a determina coeficientul de specificitate a celor două secvențe, s-au calculat pe baza programului SeaView frecvențele bazelor azotate pentru fiecare individ studiat, respectiv pentru fiecare secvență genică, redată în tabelele 7.5 și 7.6.

Tabelul 7.5 / Table 7.5

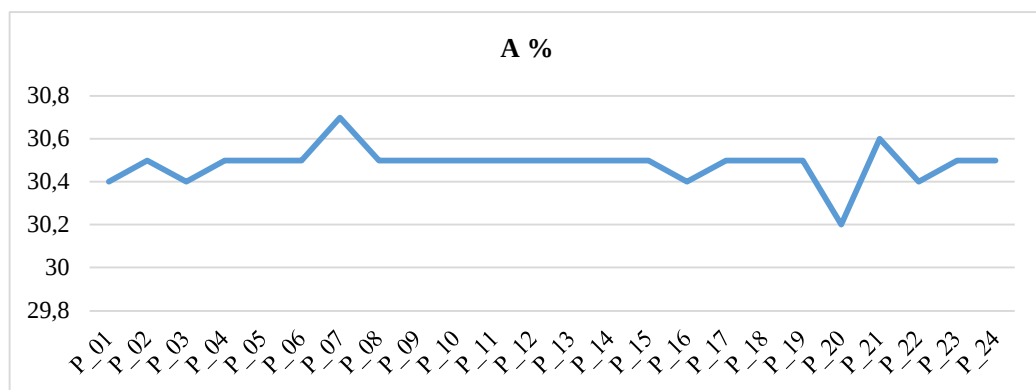
Proporțiile bazelor azotate pentru indivizii din rasa Pinzgau (secvența citocrom b)
Proportions of nitrogenous bases for Pinzgau individuals (cytochrome b sequence)

Nume probe	A %	T %	C %	G %
P_01	30,4	25,2	30,2	14,4
P_02	30,5	25,4	29,9	14,3
P_03	30,4	25,3	30,1	14,2
P_04	30,5	25,4	29,9	14,2
P_05	30,5	25,3	30,0	14,2
P_06	30,5	25,4	29,9	14,3
P_07	30,7	25,4	29,8	14,1
P_08	30,5	25,4	29,9	14,3
P_09	30,5	25,4	29,9	14,3
P_10	30,5	25,4	29,9	14,3
P_11	30,5	25,3	30,0	14,2
P_12	30,5	25,4	29,9	14,2
P_13	30,5	25,4	29,9	14,3
P_14	30,5	25,5	29,9	14,1
P_15	30,5	25,4	29,9	14,3
P_16	30,4	25,4	29,9	14,3
P_17	30,5	25,4	29,9	14,3
P_18	30,5	25,4	29,9	14,3

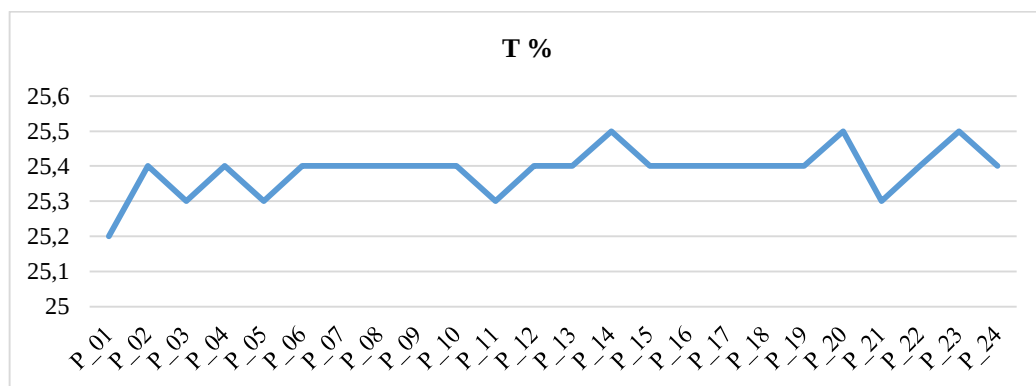
Nume probe	A %	T %	C %	G %
P_19	30,5	25,4	29,9	14,3
P_20	30,2	25,5	29,8	14,4
P_21	30,6	25,3	29,8	14,3
P_22	30,4	25,4	29,7	14,5
P_23	30,5	25,5	29,8	14,2
P_24	30,5	25,4	29,9	14,2

Din analiza frecvențelor bazelor azotate pentru secvența citocrom b, s-a obținut o frecvență medie de 30,48% pentru adenină cu valori limită cuprinse între 30,2% - 30,7% (Figura 7.11.a). În cazul timinei, frecvența medie a fost de 25,38%, cu o valoare minimă de 25,2% și o valoare maximă de 25,5% (Figura 7.11.b). Citozina a înregistrat o valoare medie de 29,9%, cu un interval cuprins între 29,7% - 30,2% (Figura 7.11.c) iar guanina a prezentat valori cuprinse în limitele 14,1% - 14,5%, cu o medie de 14,27% (Figura 7.11.d).

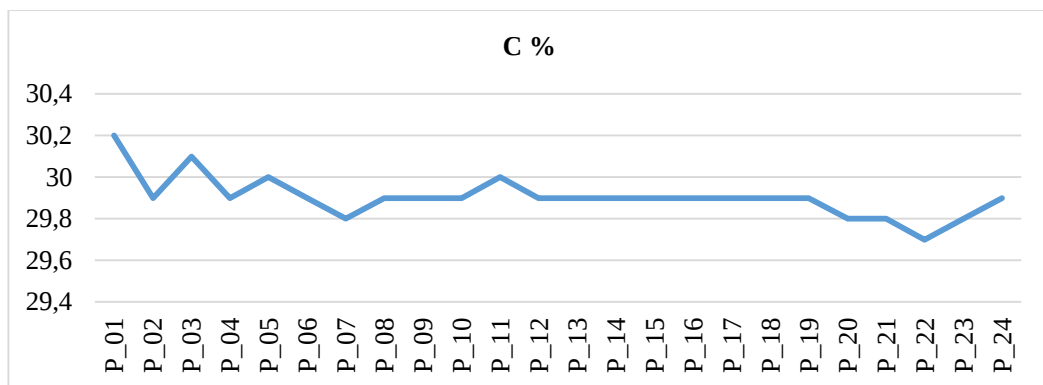
Cele mai frecvente valori au fost 30,5% pentru adenină, 25,4% pentru timina, 29,8% pentru citozină și 14,3% pentru guanină.



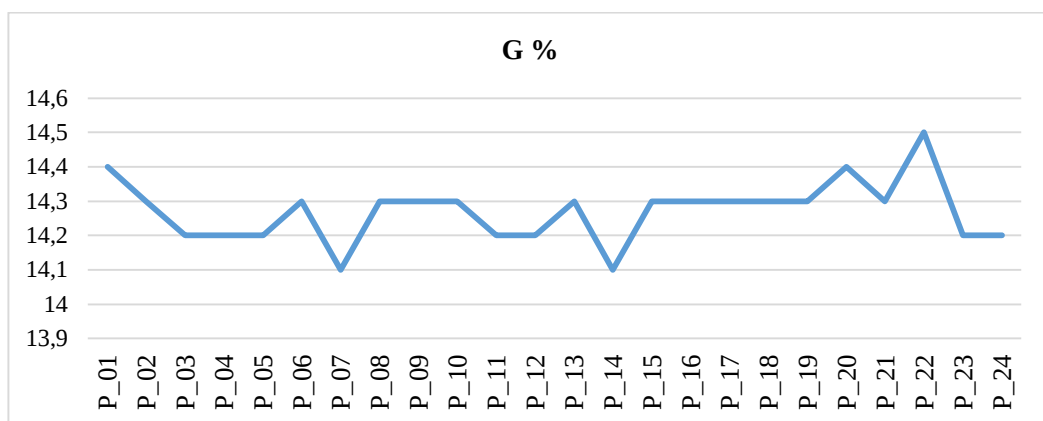
a



b



c



d

Figura 7.11. Concentrațiile de baze azotate ale secvențelor pentru gena citocrom b-Pinzgau

a. adenină-A; **b.** timidină-T; **c.** citozină-C; **d.** guanină-G

Figure 7.11. Nitrogen base concentrations of cytochrome b gene sequences -Pinzgau

a. adenine-A; **b.** thymine-T; **c.** cytosine-C; **d.** guanine-G

Tabelul 7.6 / Table 7.6

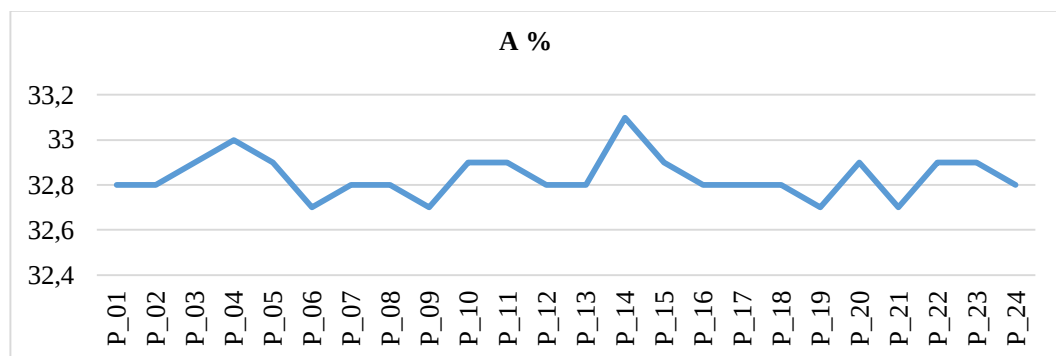
Proporțiile bazelor azotate pentru indivizii din rasa Pinzgau (secvența d-loop)

Proportions of nitrogenous bases for Pinzgau individuals (d-loop sequence)

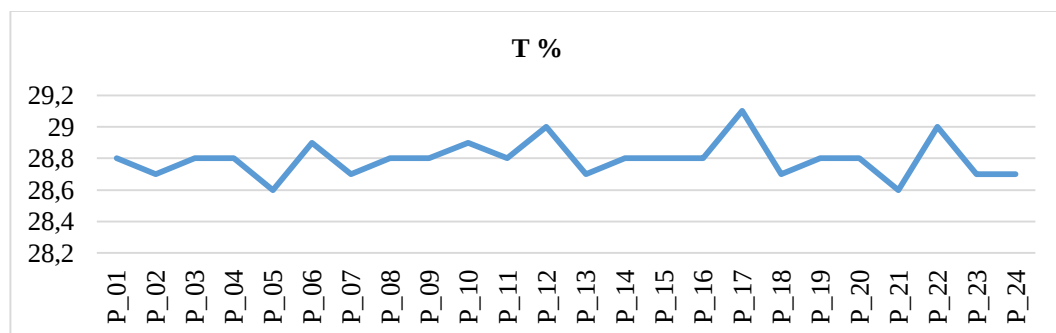
Nume probe	A %	T %	C %	G %
P_01	32,8	28,8	24,6	13,8
P_02	32,8	28,7	24,5	13,1
P_03	32,9	28,8	24,2	14,1
P_04	33,0	28,8	24,2	14,0
P_05	32,9	28,6	24,5	14,0
P_06	32,7	28,9	24,4	14,0
P_07	32,8	28,7	24,5	14,0
P_08	32,8	28,8	24,6	13,8
P_09	32,7	28,8	24,2	14,3
P_10	32,9	28,9	24,4	13,8
P_11	32,9	28,8	24,5	13,8
P_12	32,8	29,0	24,3	13,9

Nume probe	A %	T %	C %	G %
P_13	32,8	28,7	24,6	13,9
P_14	33,1	28,8	24,6	13,5
P_15	32,9	28,8	24,2	14,1
P_16	32,8	28,8	24,4	14,0
P_17	32,8	29,1	24,5	13,6
P_18	32,8	28,7	24,5	14,0
P_19	32,7	28,8	24,3	14,2
P_20	32,9	28,8	24,6	13,7
P_21	32,7	28,6	24,5	14,2
P_22	32,9	29,0	24,6	13,5
P_23	32,9	28,7	24,5	13,9
P_24	32,8	28,7	24,5	14,0

În cazul analizei secvențelor genice ale regiunii de control mitocondrial d-loop, valorile frecvențelor pentru cele patru baze au fost puțin mai mari. Astfel, adenina a prezentat o valoare medie de 32,83%, cu limite între 32,7% - 33,1% (Figura 7.12.a); timina a avut valori cuprinse între minima de 28,6% și maxima de 29,1%, cu media de 28,79% (Figura 7.12.b); citozinei îi corespunde o valoare medie de 24,44%, cu limita minimă de 24,2% și limita maximă de 24,6% (Figura 7.12.c) iar guanina a avut valori de 13,1% până la 14,3%, cu o medie de 13,88% (Figura 7.12.d).



a



b

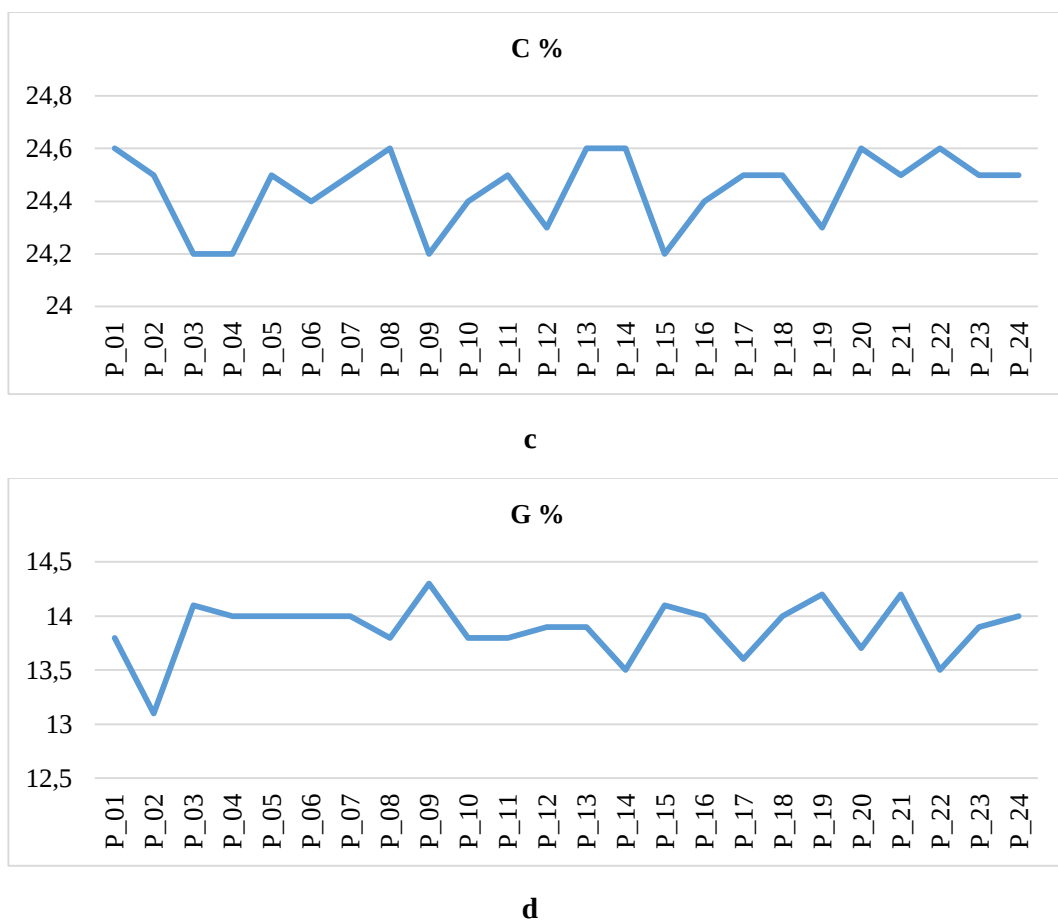


Figura 7.12. Concentrațiile de baze azotate ale secvențelor pentru regiunea de control mitocondrial d-loop-Pinzgau

a. adenină-A; **b.** timidină-T; **c.** citozină-C; **d.** guanină-G

Figure 7.12. Nitrogen base concentrations of d-loop gene sequences-Pinzgau

a. adenine-A; **b.** thymine-T; **c.** cytosine-C; **d.** guanine-G

Cele mai frecvente valori procentuale care se regăsesc și în tabelul 4.20 au fost de 32,8% pentru A, 28,8% pentru T, 24,5% pentru C și 14,0% pentru G. Toate valorile obținute se regăsesc în limite normale, neexistând abateri mari între proporțiile celor 4 baze azotate specifice fragmentelor de ADN analizate.

7.2.3. Coeficientul de specificitate

Coeficientul de specificitate evidențiază diferențele nucleotidice ale unor fragmente de ADN, pe baza cărora se pot observa elementele distincte, de ordin molecular, dintre indivizii unei specii de animale. Mai exact, calculul coeficientului de specificitate are la bază frecvențele bazelor azotate, respectiv raportul dat de sumele A+T și C+G. Valoarea acestui raport, oferă informații utile în studii de taxonomie și filogenie și se situează de regulă, în intervalul 1,2 – 1,5, pentru majoritatea speciilor de animale.

Pentru cele două secvențe genice ale citocromului b și ale regiunii d-loop, rezultatele raportului A+T/C+G sunt prezentate în tabelele 7.7 și 7.8.

Tabelul 7.7 / Table 7.8

Coeficientul de specificitate al indivizilor din rasa Pinzgau (citocrom b)

Specificity coefficient of Pinzgau individuals (cytochrome b)

Nume probe	A+T %	C+G%	A+T/C+G
P_01	55.6	44.6	1.246637
P_02	55.9	44.2	1.264706
P_03	55.7	44.3	1.257336
P_04	55.9	44.1	1.267574
P_05	55.8	44.2	1.262443
P_06	55.9	44.2	1.264706
P_07	56.1	43.9	1.277904
P_08	55.9	44.2	1.264706
P_09	55.9	44.2	1.264706
P_10	55.9	44.2	1.264706
P_11	55.8	44.2	1.262443
P_12	55.9	44.1	1.267574
P_13	55.9	44.2	1.264706
P_14	56.0	44.0	1.272727
P_15	55.9	44.2	1.264706
P_16	55.8	44.2	1.262443
P_17	55.9	44.2	1.264706
P_18	55.9	44.2	1.264706
P_19	55.9	44.2	1.264706
P_20	55.7	44.2	1.260181
P_21	55.9	44.1	1.267574
P_22	55.8	44.2	1.262443
P_23	56.0	44.0	1.272727
P_24	55.9	44.1	1.267574

Tabelul 7.8 / Table 7.8

Coeficientul de specificitate al indivizilor din rasa Pinzgau (d-loop)

Specificity coefficient of Pinzgau individuals (d-loop)

Nume probe	A+T %	C+G%	A+T/C+G
P_01	61.6	38.4	1.604167
P_02	61.5	37.6	1.635638
P_03	61.7	38.3	1.610966
P_04	61.8	38.2	1.617801
P_05	61.5	38.5	1.597403
P_06	61.6	38.4	1.604167
P_07	61.5	38.5	1.597403
P_08	61.6	38.4	1.604167
P_09	61.5	38.5	1.597403
P_10	61.8	38.2	1.617801
P_11	61.7	38.3	1.610966
P_12	61.8	38.2	1.617801
P_13	61.5	38.5	1.597403
P_14	61.9	38.1	1.624672
P_15	61.7	38.3	1.610966
P_16	61.6	38.4	1.604167
P_17	61.9	38.1	1.624672
P_18	61.5	38.5	1.597403
P_19	61.5	38.5	1.597403
P_20	61.7	38.3	1.610966
P_21	60.6	38.7	1.565891
P_22	61.9	38.1	1.624672
P_23	61.6	38.4	1.604167
P_24	61.5	38.5	1.597403

Predominanța bazelor azotate indică specificitatea ADN-ului care poate fi de tipul AT, dacă $A+T > C+G$, sau de tip GC în situația în care $A+T < C+G$. Din cele două tabele se poate observa faptul că predomină bazele azotate A și T, atât în cazul secvențelor citocromului b cât și a secvențelor d-loop, prin urmare cei 24 indivizi au ADN de tipul AT.

Valoarea medie a coeficientului de specificitate pentru secvențele aliniate ale citocromului b este de 1.246637, cu limite cuprinse între 1.277904 și 1.264776 iar pentru secvențele aliniate ale fragmentelor d-loop, valorile minimă/maximă sunt de 1.565891, respectiv 1.635638, cu o medie de 1.607311, ceea ce înseamnă că se încadrează în limitele normale, specifice organismelor de ordin animal.

7.2.4. Rețeaua de haplotipuri rezultată în urma analizei secvențelor genice ale citocromului b și d-loop

Relațiile de filogenie, estimarea timpului de divergență precum și descendența indivizilor unei specii, poate fi interpretată pe baza construcției rețelei de haplotipuri Network și a arborilor filogenetici.

În vederea realizării rețelei de haplotipuri de tip Network, secvențele genice ale citocromului b și ale regiunii de control mitocondrial d-loop, au fost analizate pe baza unor programe specifice, respectiv PopArt, SeaView și Mega X.

Reprezentarea grafică a rețelei de haplotipuri, cu inter-rețelele de conectare specifice poate fi consultată în Figura 7.13.

Au rezultat un număr de trei haplotipuri (T1/T2/T3) derivate din macrohaplogruul T, având diferite frecvențe și rețele de conectare specifice. În fiecare din cele 3 haplotipuri au fost distribuiți, în urma analizei, cei 24 indivizi din rasa Pinzgau, conform Tabelului 7.9.

Tabelul 7.9 / Table 7.9

Haplotipurile identificate și indivizii reprezentanți pentru fiecare haplotip la rasa Pinzgau
Identified haplotypes and representative individuals for each haplotype, Pinzgau breed

Haplotipuri identificate	Indivizii reprezentanți	Total indivizi/haplotip
T1	P_09	1
T2	P_01; P_11; P_12; P_20 și P_21	5
T3	P_02; P_03; P_04; P_05; P_06; P_07; P_08; P_10; P_13; P_14; P_15; P_16; P_17; P_18; P_19; P_21; P_23 și P_24	18

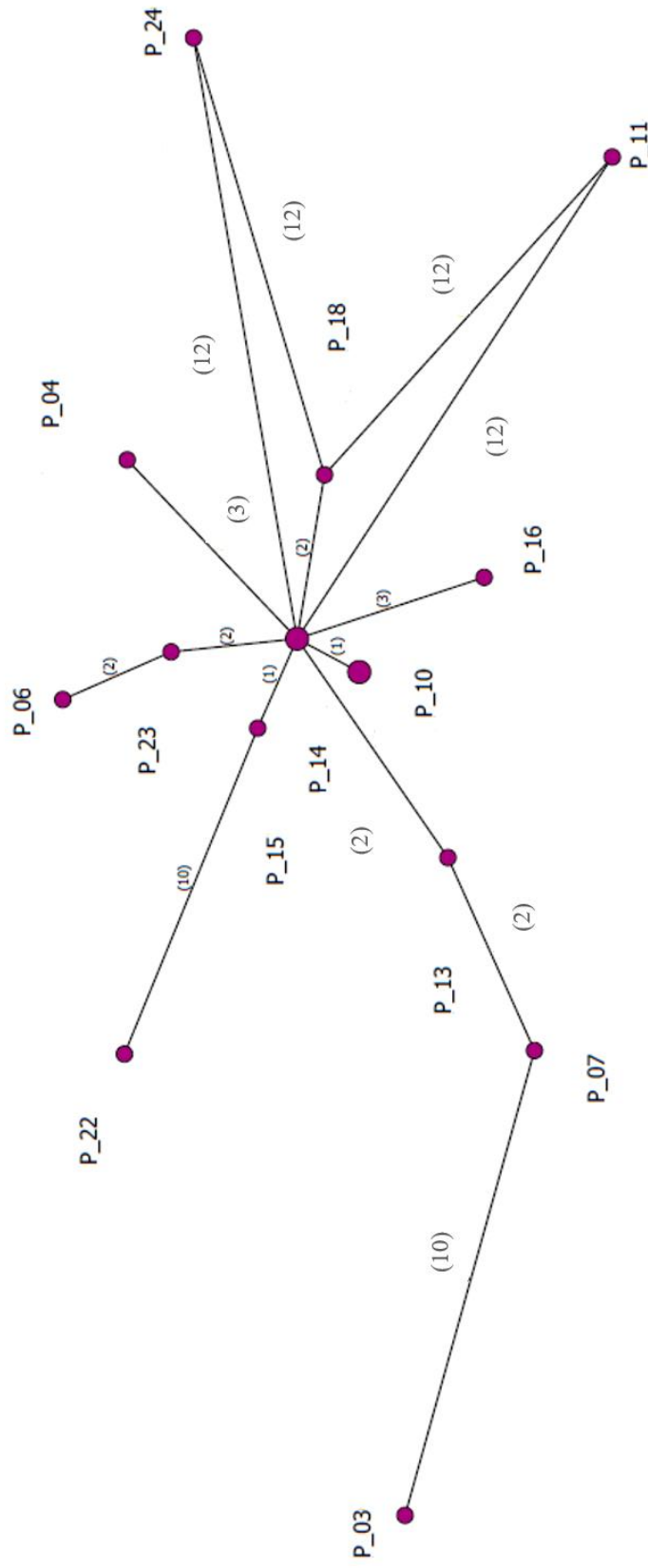


Figura 7.13. Rețeaua de haplotipuri a indivizilor din rasa Pinzgau, rezultată prin analiza secvențelor citocrom b și d-loop
Figure 7.13. The network of haplotypes of Pinzgau individuals, resulting from the analysis of cytochrome b and d-loop sequence

Distribuția celor 3 haplotipuri atribuie cea mai mare valoare procentuală a frecvenței pentru haplotipul T3 (75%), urmată de haplotipul T2, cu un procent de 21% și T1 cu doar 4%.

Conform datelor din literatură, consultate și în prima parte a tezei, haplogrupul T și subcladele sale a fost implicat într-un eveniment de domesticire, petrecut în perioada neoliticului, în Orientul Apropiat (Achilli, 2009).

În primele capitole s-a discutat despre dovezile arheologice care atestă faptul că bovinele au trecut prin două mari evenimente de domesticire, respectiv, primul eveniment care a avut loc în sud-vestul Asiei, dând naștere bovinelor cu descendență în *Bos primigenius* și al doilea din care a evoluat zebu sau *Bos indicus* (Loftus et. al., 1994; Troy et. al., 2001).

Analizele ADN-ului mitocondrial la rasele de bovine din Europa au demonstrat apartenența majorității acestora la haplogrupul T, cu o estimare a timpului de divergență de ~ 16 mii ani. Acest haplogrup T, este divizat în două subclade surori, respectiv T1-T2-T3 (în care au fost identificați cei 24 indivizi analizați, din rasa Pinzgau) și subcladele T4-T5 (Mannen et. al., 2004; Bradley et. al., 1996).

Haplogrupurile T și P'QT, identificate la rasa Sură de Stepă au fost implicate în același proces de domesticire în Cornul Abundenței (Achilli et. al., 2008; Achilli et. al., 2009).

Divergența secvențelor în cadrul haplogrupului T este extrem de mică (de ~ 8 ori mai mică decât în cazul studiilor de filogenie ce au la bază analiza ADN-ului mitocondrial uman) (Torroni et. al., 2006).

Subcladele haplogrupului T sunt structurate din punct de vedere geografic, astfel: T1 preponderent răspândit în Africa, T3 predominant în Europa și T4 specific raselor din Asia de Est (Bradley et. al., 1996; Bradley et. al., 2006; Bonfiglio et. al., 2010).

În figura 7.14 sunt reprezentate haplogrupurile specifice rasei Sură de Stepă la care s-au adăugat indivizii analizați din rasa Pinzgau, în funcție de apartenența acestora în cadrul haplotipurilor derivate din T.

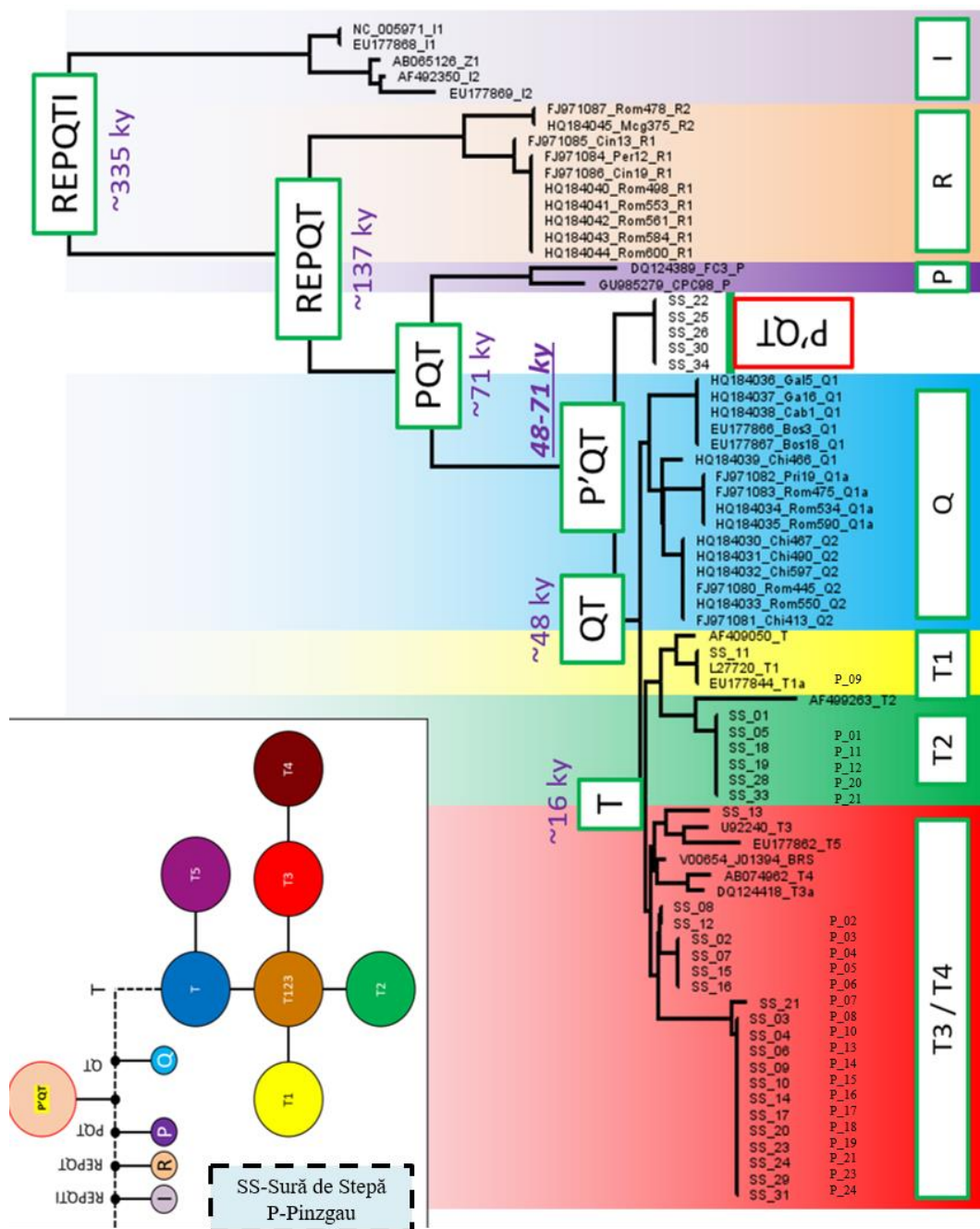


Figura 7.14. Arborele filogenetic construit prin analiza secvențelor genei citocrom b și estimarea timpului de divergență în cadrul rasei Pinzgau

Figure 7.14. Phylogenetic tree obtained from cytochrome b gene analysis and estimation of time divergence, Pinzgau breed

În concluzie, analizele secvențelor genice ale genomului mitocondrial la rasa Pinzgau, au demonstrat apartenența celor 24 indivizi studiați în cadrul macro-haplogrupului T, cu subcladele sale surori ($T3 > T2 > T1$). Cu privire la distanța genetică dintre haplogrupurile T1, T2 și T3, aceasta variază între 1 și 12 situsuri.

Prezența haplotipurilor derivate din haplogrupul T sugerează un model de expansiune demografică a acestor indivizi și totodată, descendența acestora în *Bos taurus* precum și domesticirea în Cornul Abundenței, în perioada neoliticului (Magee et. al., 2014).

7.2.5. Dinamica ratei de evoluție a markerilor mitocondriali studiați

Modelul optim de substituție pentru cele două seturi de date (secvențele nucleotidice aliniate în programul Mega X, ale citocromului b și ale regiunii d-loop) a fost calculat pe baza software-ului JmodelTest (Darriba et al., 2012).

În tabelul 7.10 pot fi consultate rezultatele obținute cu privire la calculul modelului optim de substituție.

Un număr de 24 secvențe ale citocromului b pentru indivizii din rasa Pinzgau au fost analizate prin aliniere în bloc, lungimea totală a unei secvențe fiind de 1140 perechi baze. S-au observat un număr de 23 situsuri variabile, reprezentând un procent de 1,98%, din care 17 situsuri informative, însumând o valoare procentuală de 1,6%. În cazul secvențelor d-loop, situsurile variabile au fost în număr de 22 (2,44%) iar cele informative, au fost în număr de 15 (1,61%).

Tabelul 7.10 / Table 7.10

Numărul de situsuri și raportul Tr/Tv pentru secvențele genice studiate-rasa Pinzgau
Number of sites and Tr / Tv ratio for the studied gene sequences, Pinzgau breed

Rasa	Secvența	Nr. situsuri informative	%	Nr. situsuri variabile	%	Tr/Tv
Pinzgau	Cyt B	17	1,51	23	1,98	0,637
	D-loop	15	1,61	22	2,44	5,267

În figura 7.15 se observă următoarele frecvențe pentru bazele azotate: 30,5% pentru A, 25,4% pentru T, 14,3% pentru G și 29,9% pentru C (secvența citocrom b). În cazul secvenței d-loop, frecvențele au următoarele valori: 32,6% A, 29,1% T, 13,8% G și 24,5 C. Transversiile de tip A-G și T-C au valori de 4,6481 respectiv 0,5065 (Figura 7.15.a), raportul dintre acestea fiind de 0,637 (Tabelul 7.10.).

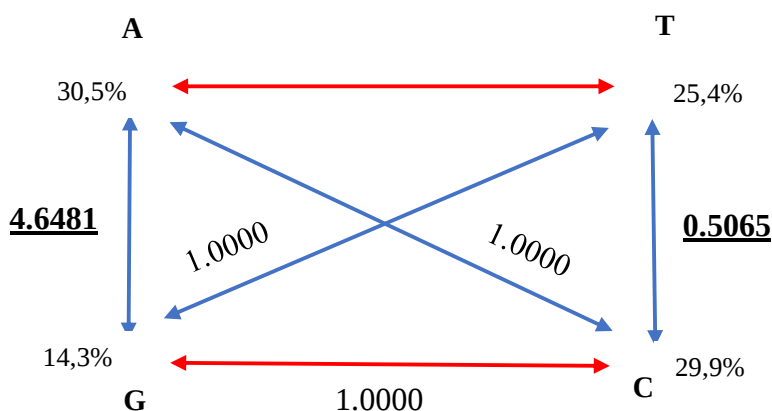


Figura 7.15.a. Ratele de substituție pentru nucleotide, calculate cu jModelTest pentru un set de 24 secvențe ale genei citocrom b provenite de la indivizi aparținând rasei de bovine Pinzgau

Figure 7.15.a. Substitution rates for each nucleotide, calculated in jModelTest for a set of 24 cytochrome b gene sequences, Pinzgau cattle breed

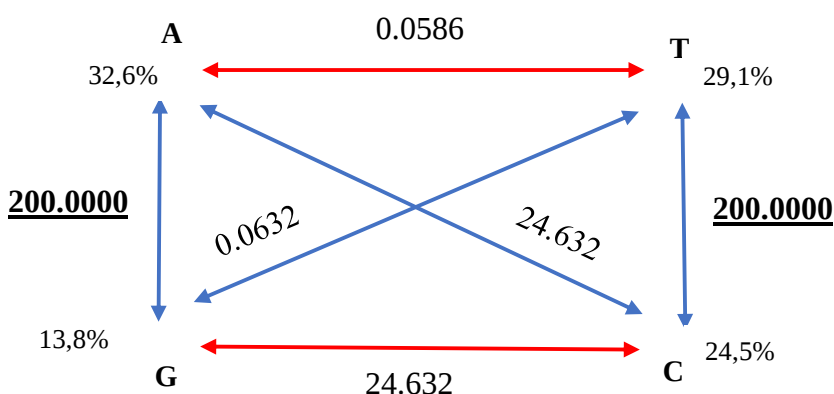


Figura 7.15.b. Ratele de substituție pentru fiecare nucleotidă, calculate în jModelTest pentru un set de 24 secvențe ale genei d-loop provenite de la indivizi aparținând rasei de bovine Pinzgau

Figure 7.15.b. Substitution rates for each nucleotide, calculated in jModelTest for a set of 32 d-loop gene sequences, Pinzgau cattle breed

În vederea evaluării relațiilor filogenetice dintre indivizii din rasa Pinzgau, având la bază analiza secvențelor nucleotidice ale celor două regiuni mitocondriale studiate, au fost realizați arbori filogenetici de tip ML/NJ, utilizând programul SeaView, reprezentați grafic în figurile 7.16 (secvențe citocrom b) și 7.17 (secvențe d-loop).



Figura 7.16. Arbore filogenetic realizat pe baza analizei secvențelor genice ale citocromului b, pentru indivizii din rasa Pinzgau

Figure 7.16. Phylogenetic tree based on cytochrome b gene sequence analysis for Pinzgau breed

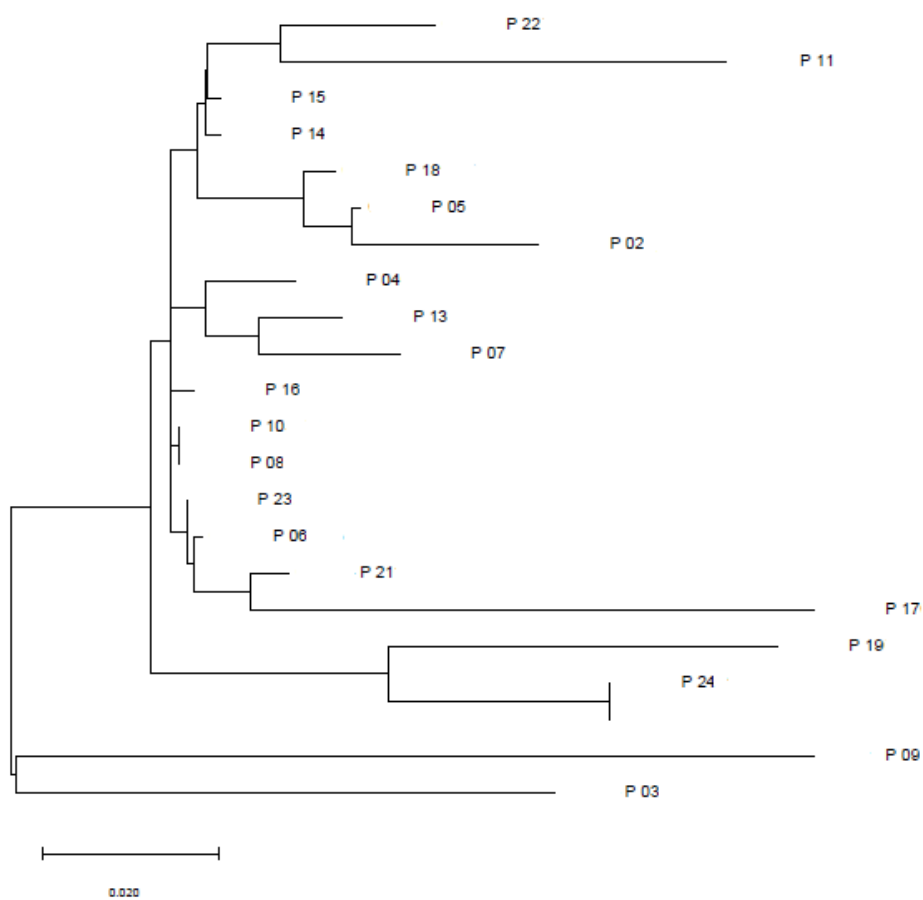


Figura 7.17. Arbore filogenic realizat pe baza analizei secvențelor genice ale d-loop, pentru rasa Pinzgau
Figure 7.17. Phylogenetic tree based on d-loop gene sequence analysis for Pinzgau breed

7.2.6. Expansiunea demografică și spațială a populației de bovine din rasa Pinzgau

Conform expansiunii demografice, evidențiată pe baza modelului de calcul *Mismatch distribution* se poate observa distribuția numărului de diferențe ce se regăsesc între perechile de haplotipuri. Distribuția demografică poate fi de formă unimodală (întâlnită în cazul populațiilor de animale care au trecut printr-o expansiune demografică recentă, fie se poate discuta despre o expansiune spațială asociată unui grad mare de migrație) sau de formă multimodală (întâlnită la populațiile aflate în echilibru demografic).

Indivizii din rasa Pinzgau au prezentat o distribuție de tip multimodal, rezultată atât din analiza secvențelor nucleotidice ale citocromului b cât și a regiunii de control mitocondrial d-loop (Figura 7.18. a și b).

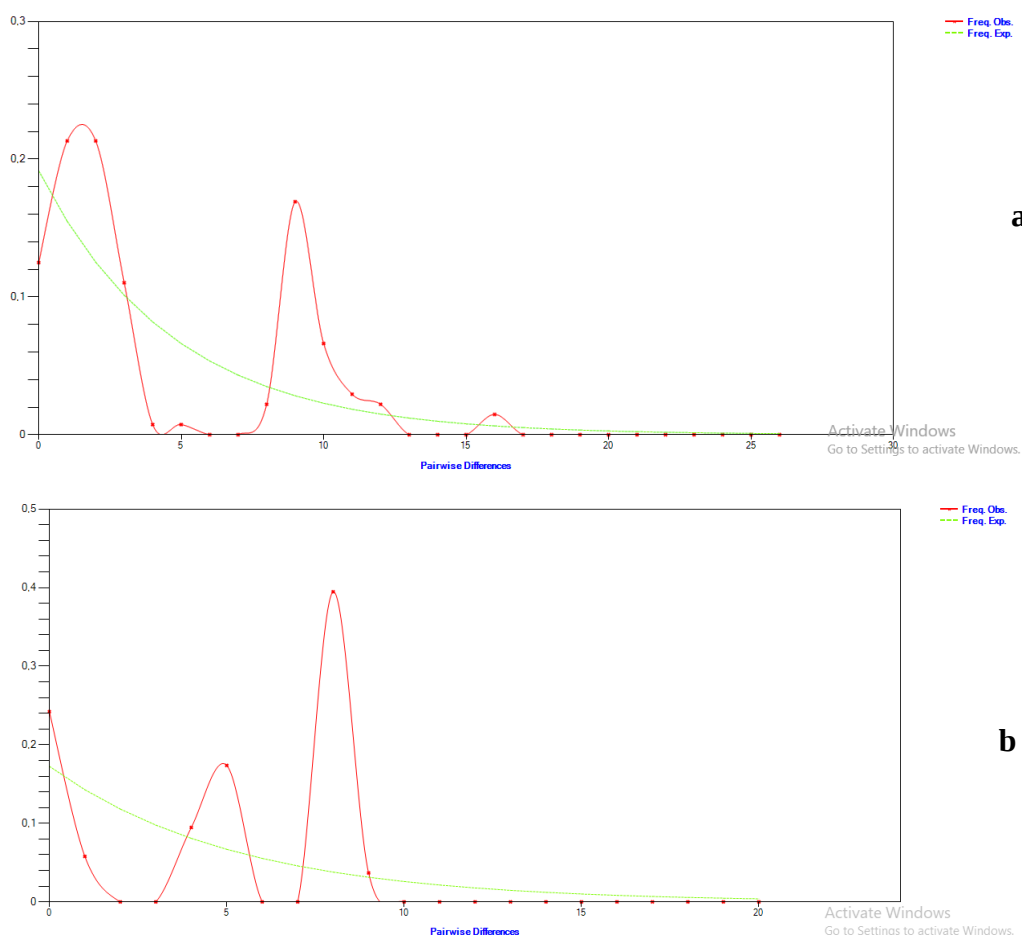


Figura 7.18. Expansiunea demografică pentru indivizii din rasa Pinzgau (**a.** citocrom b; **b.** d-loop)

Figure 7.18. Demographic expansion for Pinzgau breed (a. cytochrome b; b. d-loop)

Valorile obținute arată o distribuție asimetrică a datelor, prin urmare rasa Pinzgau, (reprezentată în această cercetare de cele 24 femele din cadrul S.C.D.C.B., Târgu-Mureș) se află în echilibru demografic. Graficele rezultate prin analiza *Mismatch distribution* subliniază atât diferențele observate (Freq. Obs.) cât și cele așteptate (Freq. Exp.).

Analiza dezechilibrul linkage – LD

Au fost analizate secvențele genice ale citocromului b și ale d-loop, pentru indivizii din rasa Pinzgau, cu scopul de a calcula valoarea LD-Dezechilibrului linkage pentru cei doi markeri de interes (Figura 7.19 a și b).

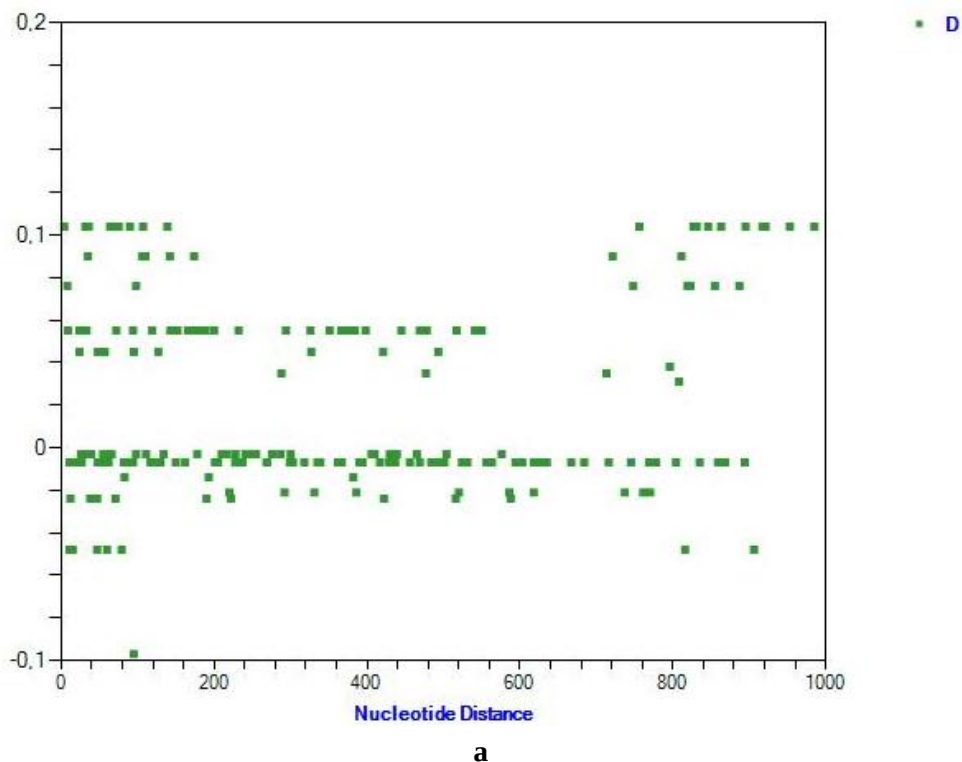
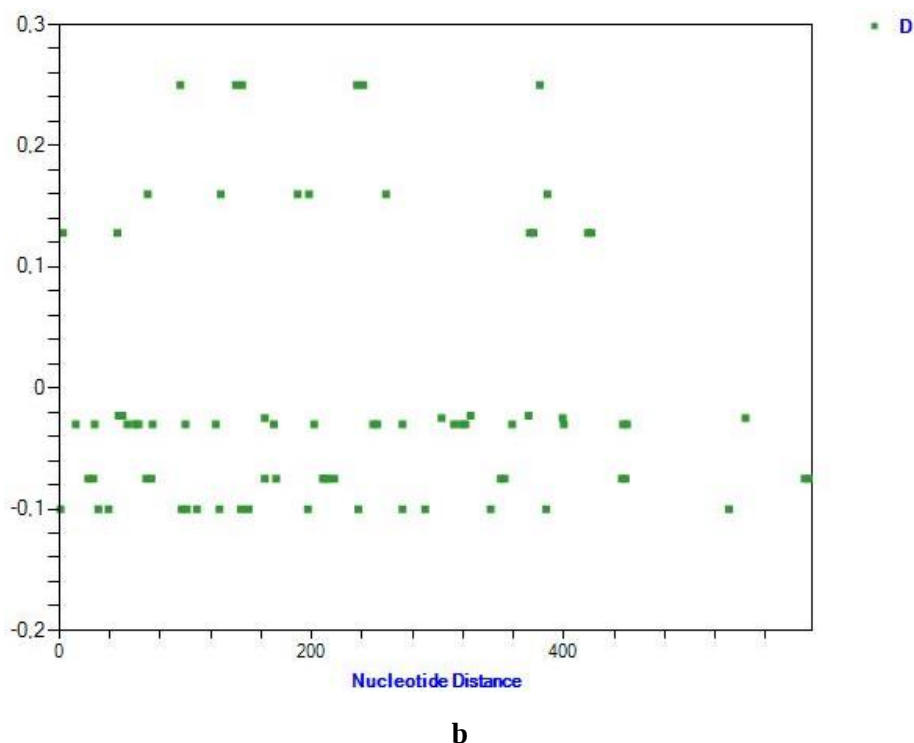


Figura 7.19. a. Distanța între nucleotide (citocrom b, Pinzgau)
Figure.7.19.a. Nucleotide distance (cytochrome b, Pinzgau)



b
Figura 7.19.b. Distanța între nucleotide (d-loop, Pinzgau)
Figure 7.19.b. Nucleotide distance (d-loop, Pinzgau)

La fel ca și în cazul rasei Sură de Stepă, s-a obținut o valoare p-statistică, cuprinsă între 0.01-0.05, ceea ce înseamnă o probabilitate semnificativă ca dezechilibrul linkage să fie prezent și în acest caz.

Rezultatele obținute în urma analizei diversității genetice a raselor Sură de Stepă și Pinzgau sunt considerate a fi un instrument important în elaborarea programelor de conservare a celor două rase, aflate la momentul actual într-un mare pericol de extincție.

CAPITOLUL 8

RECOMANDĂRI DE MANAGEMENT

CHAPTER 8

MANAGEMENT RECOMMENDATIONS

Păstrarea genofondului celor două rase de bovine, necesită aplicarea unor măsuri suplimentare și alocarea unor resurse financiare considerabile. Pentru a concepe strategii de conservare adecvate și eficiente, trebuie luate în considerare o serie de cunoștințe exacte despre toți indivizii existenți în cadrul unei populații. Prin urmare, se recomandă cercetări suplimentare, care să aibă în vedere analiza genomului mitocondrial complet, a cromozomului Y (partea paternă), a microsateliților, analiza ADN-ului extras de la fosile sau resturi osoase aparținând taurinelor cu descendență directă în *Bos taurus*, asigurând astfel o mai bună înțelegere a structurii genetice reale și a istoriei anterioare a populațiilor studiate.

Domeniul zootehnic și mai cu seamă tehnologia creșterii bovinelor se confruntă la momentul actual cu o serie de probleme, cum sunt conservarea raselor aflate în risc de abandon, gestionarea durabilă a resurselor genetice și managementul adecvat. Pentru a asigura o zootehnie sustenabilă, modernă, programele clasice de ameliorare și selecție sunt insuficiente, iar pe lângă faptul că sunt costisitoare din punct de vedere temporal și financiar, sunt caracterizate, în general, de o acuratețe limitată. Limitările impuse de aceste tehnici clasice pot fi înlăturate prin aplicarea biotehnicilor moderne de reproducere (fertilizare in vitro și embriotransfer), la care se adaugă metodele de screening genetic.

Cercetările actuale cu privire la rasele de bovine autohtone aflate în pericol de extincție, la nivel internațional, au fost focalizate pe dezvoltarea unor programe eficiente de management genetic și aplicarea procesului de selecție genomică în cadrul programelor de conservare dar și pe valorificarea acestor rase, prin elaborarea unor strategii de marketing, implementate cu succes în promovarea produselor animaliere obținute de la rase locale (materii prime - lapte, carne).

Problema păstrării și conservării raselor locale este importantă pentru asigurarea securității alimentare a populației României și nu numai, având în vedere schimbările climatice din ultimul timp cât și fenomenele extreme, care ar putea aduce noi provocări în viitor. Specia bovină este cea mai expusă la aceste schimbări, prin urmare rasele Sură de Stepă și Pinzgau ar putea constitui o alternativă eficientă la rasele ameliorate, datorită calităților deosebite de rezistență și adaptabilitate la diferiți factori de stres.

Procesul de selecție genetică reprezintă un indicator de mare importanță în domeniul zootehniei, oferind avantaje considerabile. Informațiile genetice facilitează prevalarea unor trăsături comportamentale, productive și de bunăstare a animalelor, fiind

capabile să mărească considerabil rata progresului genetic la bovinele specializate pentru producția de lapte. Prin urmare, ameliorarea genetică a efectivelor de animale este o acțiune cu caracter prioritar în strategia de dezvoltare a zootehniei la nivelul Uniunii Europene (Directiva 2009/157/CE a Consiliului), cât și la nivel național, conform HG nr. 77/2019. Însă, o condiție prealabilă pentru dezvoltarea zootehniei și implicit pentru gestionarea sustenabilă a resurselor genetice la rasele de bovine din România este dezvoltarea infrastructurii și a tehnicilor de fertilizare in vitro, de embriotransfer și de genetică moleculară aplicată.

La nivel național, se fac primii pași spre aplicarea acestor tehnici, fiind finanțate proiecte de dezvoltare și implementare a fertilizării in vitro sau a screeningului genetic. Din păcate, până în prezent nu există informații privind dezvoltarea/aplicarea coroborată a ambelor tehnici (fertilizare in vitro și screening genetic) în aceeași unitate de profil zootehnic bovin.

În general, deși progresele făcute în domeniu sunt remarcabile, nu sunt însoțite întotdeauna și de posibilitatea implementării acestora în practică, fie datorită lipsei cunoștințelor necesare, fie lipsei infrastructurii specifice (fiind necesară achiziția de noi echipamente care să faciliteze punerea în practică).

Majoritatea țărilor Uniunii Europene oferă sprijin financiar crescătorilor de rase autohtone pe cale de dispariție prin intermediul schemelor implementate de către Programele de Dezvoltare Rurală (P.D.R) și supravegheate de asociațiile locale de reproducere și de programele naționale de monitorizare a resurselor genetice, având cofinanțare dintr-un program finanțat la nivel național (exp. Austria, Germania, Italia și Irlanda).

Viitoarele programe de conservare a raselor Sură de Stepă și Pinzgau trebuie să aibă în vedere extinderea celor două nuclee până la un număr de cel puțin 50 de indivizi, pentru a se evita pierderea genelor specifice din genofond prin fenomenul de drift genetic și respectiv evitarea pericolului de consangvinizare.

Pentru o estimare cât mai exactă a originii filogenetice este necesară utilizarea probelor de ADN atât de la rasele de bovine din grupul *Podolian Grey*, pentru rasa Sură de Stepă, cât și de la resturile osoase aparținând genului *Bos taurus primigenius* astfel încât să se poată identifica liniile materne de încrucișare cât și distanța genetică minimă față de ancestor (*B. t. primigenius*).

Estimarea originii filogenetice necesită estimarea relațiilor filogenetice și a timpului de divergență dintre liniile materne utilizând mtDNA, prin construcția arborilor BI (Bayesian inference) cu suport topologic ridicat, evaluarea diversității genetice inter și intra-populaționale la rasele bovine podolice prin analiza microsateliților, pentru identificarea originii la nivel genomic. De asemenea, este necesară analiza de identificare a markerilor moleculari asociați parametrilor de producție (lapte, carne), prin estimarea in silico a numărului potențial de situsuri de restricție și implicit numărul de loci din regiunile genomice asociate parametrilor de producție, obținuți prin tehnici RADseq (Restriction Associated DNA sequencing).

Un aspect important pentru a asigura un program eficient de conservare îl reprezintă conservarea materialului genetic prin criogenarea probelor (țesut și ADN genomic) și crearea unei baze de date cu probele arhivate, parametrii fenotipici și profilul genotipic al fiecărui individ, astfel încât să se asigure propagarea rasei. Analizele genomice, aplicarea biotehnicilor de reproducere și crearea unei bănci de material genetic vor contribui la conservarea activă a celor două rase și eliminarea acestora din lista celor aflate în pericol de extincție precum și la dezvoltarea orientărilor specifice, sub aspect economic, genetic și cultural.

CONCLUZII

CONCLUSIONS

Rezultatele cercetărilor privind cuantificarea variabilității genetice a celor două rase de bovine Sură de Stepă și Pinzgau din România și identificarea relațiilor filogenetice în cadrul subfamiliei *Bovinae* au condus la formularea următoarelor concluzii:

- cuantificarea spectrofotometrică a ADN-ului total a validat cantitativ și calitativ etapa de izolare a acidului dezoxiribonucleic făcând posibilă trecerea la următoarele etape de analiză;

- prin migrarea produșilor PCR în gel de agaroză, s-a constatat faptul că nu au avut loc amplificări nespecifice și nici nu au avut loc contaminări iar primerii utilizați pentru amplificare au prezentat un grad ridicat de specificitate pentru cei doi markeri mitocondriali analizați, citocrom b și d-loop;

- ca urmare a secvențierii markerilor mitocondriali citocrom b și d-loop s-a constatat faptul că aceștia prezintă o relevanță deosebită în evidențierea diferențelor genetice și stabilirea filogeniei dintre indivizii unei specii;

- analizele moleculare efectuate privind diversitatea genetică, expansiunea demografică și spațială a celor două rase de bovine din România, demonstrează sustenabilitatea spațio-temporală a indivizilor, aspect favorabil procesului de reintroducere în libertate a acestora;

- cercetările filogenetice efectuate, au demonstrat că pentru a cuantifica corect relațiile filogenetice din cadrul subfamiliei *Bovinae* și pentru a estima timpul de divergență, nu este suficientă folosirea unui arbore cu suport topologic ridicat, acesta nefiind capabil să estimeze corect vârsta cladelor ci analiza unor markeri mitocondriali concatenați și analizați individual pentru rasele de bovine incluse în studiu;

- prin investigațiile moleculare efectuate s-a constatat că gena citocrom b reprezintă markerul mitocondrial cel mai capabil să evalueze corect relațiile filogenetice din cadrul subfamiliei *Bovinae*.

În cazul rasei Sură de Stepă, pe baza analizei datelor din pedigree s-a observat că dimensiunea populației din rasa Sură de Stepă a înregistrat o fază de creștere accentuată, cu un maxim de 88 indivizi identificați în 2007, urmând apoi o fază scurtă de scădere a numărului de exemplare (2007-2009) iar din 2010 este stabilă la aproximativ 58 de indivizi.

Raportul naștere-deces a fost pozitiv, cu o rată medie a natalității de 8,3 indivizi/an și o rată medie a mortalității de 6 indivizi/an.

Durata medie de viață a fost de doar 6,4 ani însă intervalul mediu între generații a fost destul de ridicat, 12,75; această valoare fiind influențată de vârsta femelelor, care variază între 0 - 24 ani, în timp ce masculii au o durată de viață de cel mult 5 ani.

Coeficientul de consangvinizare a prezentat valori cuprinse în intervalul 0-0,39, în timp ce nivelul de diversitate genetică pentru populația studiată a fost de 94%. Contribuția genetică a indivizilor cu origini neclare sau cu aspect nespecific al rasei a scăzut treptat în timp, de la ~ 50% în 2002 la mai puțin de 3% în 2019.

Ca urmare a secvențierii genei citocrom b și a regiunii de control mitocondrial d-loop s-a constatat faptul că aceștia prezintă o relevanță deosebită în evidențierea diferențelor genetice și stabilirea filogeniei dintre indivizii unei specii.

Prin analiza și interpretarea secvențelor genice s-au identificat un număr de 4 haplogrupuri, cu diferite frecvențe (T1-3%, T2-19%, T3/T4-62% și P'QT-16%), în care au fost încadrați cei 32 indivizi studiați.

Identificarea haplogrupului P'QT în urma analizei secvențelor nucleotidice ale rasei de bovine Sură de Stepă, indică faptul că acest haplogrup este de tip ancestral, fiind specific bourului (*Bos taurus primigenius*), din care a evoluat această rasa.

În cadrul acestui haplogrup au fost identificați un număr de 5 indivizi, reprezentând un procent de 16% din totalul exemplarelor analizate, care ar putea fi utilizați în cadrul selecției, pentru încrucișări, cu scopul de a conserva rasa în stare pură.

În cazul rasei Pinzgau, ca și în cazul rasei Sură de Stepă, s-a identificat frecvența haplogrupurilor pentru cei 24 indivizi, atât pe baza analizei secvențelor genice ale citocromului b cât și a regiunii de control mitocondrial d-loop. De asemenea, s-a calculat proporția celor patru baze azotate pentru ambele secvențe precum și coeficientul de specificitate pe baza raportului A+T/G+C. S-a urmărit în ansamblu, dinamica ratei de evoluție a celor doi markeri mitocondriali și expansiunea demografică a grupului de indivizi analizați.

Ca urmare a analizei secvențelor genice, spre deosebire de rasa Sură de Stepă, în cazul rasei Pinzgau au fost identificate 3 haplotipuri derivate din macro-haplogrupul T, având frecvențe diferite (T1, T2 și T3). Cei 24 de indivizi au fost distribuiți în haplotipurile corespunzătoare, astfel: 18 indivizi aparținând haplotipului T3 (75%), 5 indivizi identificați în cadrul haplotipului T2 (21%) și un singur individ reprezentant pentru haplotipul T1 (4%).

Analizele ADN-ului mitocondrial la rasele de bovine din Europa au demonstrat apartenența majorității acestora la haplogrupul T și subcladele sale, cu o estimare a timpului de divergență de ~ 16 mii ani. Acest haplogrup T, este divizat în două subclade surori, respectiv T1-T2-T3, în care au fost identificați o mare parte din indivizii aparținând celor două rase analizate.

Haplogrupurile T și P'QT, identificate la rasa Sură de Stepă au fost implicate în același proces de domesticire în Cornul Abundenței.

Rezultatele acestei cercetări, pot contribui la îmbunătățirea programului de conservare a celor două rase de bovine și a informațiilor actuale cu privire la diversitatea genetică, reprezentând un instrument valoros pentru eforturile privind conservarea rezervelor de gene aflate în pericol de extincție.

CONCLUSIONS

The results of this research, regarding the quantification of the genetic variability of two cattle breeds, Grey Steppe and Pinzgau from Romania and the identification of phylogenetic relations within the subfamily *Bovinae* led to the formulation of the following conclusions:

- the spectrophotometric quantification of the total DNA validated quantitatively and qualitatively the isolation step of deoxyribonucleic acid, making it possible to move on to the next analysis steps;

- by migrating the agarose gel PCR products, it was found that there were no nonspecific amplifications and no contaminations and the primers used for amplification showed a high degree of specificity for the two mitochondrial markers analyzed, cytochrome b and d-loop;

- as a result of the sequencing of the cytochrome b and d-loop mitochondrial markers, it was found that they are of particular relevance in highlighting genetic differences and establishing phylogeny between individuals;

- the molecular analyzes performed regarding the genetic diversity, the demographic and spatial expansion of the two cattle breeds in Romania, demonstrate the spatio-temporal sustainability of the individuals, aspect favorable to the process of their reintroduction in freedom;

- phylogenetic research has shown that in order to correctly quantify the phylogenetic relationships within the subfamily *Bovinae* and to estimate the time of divergence, it is not enough to use a tree with high topological support, which is not able to correctly estimate clade age but analyze mitochondrial markers concatenated and analyzed individually for the cattle breeds included in the study;

- through the molecular investigations performed, it was found that the cytochrome b gene represents the mitochondrial marker most able to correctly evaluate the phylogenetic relationships within the *Bovinae* subfamily.

In the case of Grey Steppe breed, based on the analysis of pedigree data, it was observed that the size of the population registered a phase of accentuated growth, with a maximum of 88 individuals identified in 2007, followed by a short phase of decrease of specimens (2007-2009) and since 2010 is stable at about 58 individuals.

The birth-death ratio was positive, with an average birth rate of 8.3 individuals/year and an average mortality rate of 6 individuals/year.

The average life expectancy was only 6.4 years but the average interval between generations was quite high, 12.75; this value is influenced by the age of females, which varies between 0 - 24 years, while males have a lifespan of no more than 5 years.

The inbreeding coefficient showed values in the range 0-0.39, while the level of genetic diversity for the studied population was 94%. The genetic contribution of individuals with unclear or nonspecific origins has gradually decreased over time, from ~ 50% in 2002 to less than 3% in 2019.

As a result of the sequencing of the cytochrome b gene and the d-loop mitochondrial control region, it was found that they are of particular relevance in highlighting genetic differences and establishing phylogeny between individuals of a species.

By analyzing and interpreting the gene sequences, a number of 4 haplogroups were identified, with different frequencies (T1-3%, T2-19%, T3/T4-62% and P'QT-16%), in which they were included the 32 individuals studied.

The identification of the P'QT haplogroup following the analysis of the nucleotide sequences of the Grey Steppe cattle breed, indicates that this haplogroup is of ancestral type, being specific to the ox (*Bos taurus primigenius*), from which this breed evolved.

Within this haplogroup, a number of 5 individuals were identified, representing a percentage of 16% of the total analyzed specimens, which could be used in the selection, for crosses, in order to preserve the purebred breed.

In the case of Pinzgau breed, as in the case of Grey Steppe breed, the haplogroup frequency for the 24 individuals was identified, both based on the analysis of the cytochrome b gene sequences and the d-loop mitochondrial control region. The proportion of the four nitrogenous bases for both sequences as well as the specificity coefficient were also calculated based on the A+T/G+C ratio. Overall, the dynamics of the evolution rate of the two mitochondrial markers and the demographic expansion of the group of individuals analyzed were followed.

As a result of the analysis of gene sequences, unlike the Grey Steppe breed, in the case of the Pinzgau breed, 3 haplotypes derived from the macro-haplogroup T were identified, having different frequencies (T1, T2 and T3). The 24 individuals were distributed in the corresponding haplotypes, as follows: 18 individuals belonging to the T3 haplotype (75%), 5 individuals identified within the T2 haplotype (21%) and one individual representative for the T1 haplotype (4%).

Mitochondrial DNA analyzes in European cattle breeds have shown that most of them belong to the T haplogroup and its subclades, with an estimated time of divergence of ~ 16 thousand years. This haplogroup T, is divided into two sister subclades, respectively T1-T2-T3, in which a large part of the individuals belonging to the two analyzed races were identified.

The T and P'QT haplogroups, identified in the Grey Steppe breed, were involved in the same domestication process.

The results of this research can help to improve the conservation program of the two cattle breeds and current information on genetic diversity, as a valuable tool for efforts to conserve endangered gene reserves.

ELEMENTE DE ORIGINALITATE ALE TEZEI DE DOCTORAT

ORIGINALITY OF THE DOCTORAL THESIS

În contextul fenomenului general de diminuare a diversității genetice, în special la bovine, conservarea speciilor amenințate cu dispariția joacă un rol primordial. Având în vedere faptul că rasele de bovine Sură de Stepă și Pinzgau prezintă efective reduse de indivizi, se impune necesitatea imperativă de caracterizare a genofondului, ca o primă măsură de implementare a managementului conservativ, sustenabil al raselor.

Dispariția unor populații de animale poate afecta iremediabil biodiversitatea resurselor genetice, care este esențială pentru producția materiilor prime de origine animală și conservarea diversității teritoriului, ca sursă de venit pentru fermieri și totodată parte importantă a moștenirii naturale și culturale a unei țări.

Prezenta teză de doctorat înglobează o serie de contribuții științifice originale aduse prin analiza diversității genetice și a relațiilor filogenetice a indivizilor din rasele de bovine Sură de Stepă și Pinzgau, aflate în pericol de extincție în România, contribuind astfel la înlăturarea unor incertitudini taxonomice din cadrul familiei *Bovidae* și furnizând totodată informații valoroase pentru implementarea unor programe adecvate de conservare genetică.

Cercetările efectuate în cadrul acestei teze de doctorat, au constat în analiza a doi markeri mitocondriali, relevanți în studii de diversitate genetică, filogenie și filogeografie moleculară, respectiv gena citocrom b și regiunea de control mitocondrial d-loop, pentru un număr de 32 de indivizi din rasa Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu și 24 indivizi din rasa Pinzgau din cadrul S.C.D.C.B., Târgu-Mureș. De asemenea, au fost identificate și corelate procesele evolutive fundamentale, precum fluxul de gene, expansiunea demografică și spațială, speciația și relațiile interspecifice, reprezentând factori de decizie în elaborarea unor recomandări de ordin taxonomic.

Până la momentul actual nu se cunosc studii cu privire la analiza ADN-ului mitocondrial care să asigure o estimare cât mai precisă a originii filogenetice a raselor Sură de Stepă și Pinzgau din România, astfel încât să se poată identifica liniile materne de încrucișare cât și distanța genetică minimă față de ancestor (*Bos taurus primigenius*).

Estimarea originii filogenetice a celor două rase de bovine s-a concretizat prin estimarea relațiilor filogenetice și a timpului de divergență dintre liniile materne utilizând ADN mitocondrial, prin construcția arborilor BI (Bayesian inference) cu suport topologic ridicat, evaluarea diversității genetice inter și intra-populațională corelată cu background-ul genetic determinat prin pedigree și structura populației.

Gradul de noutate și de complexitate al acestei teze de doctorat este asigurat de abordarea unor obiective de maximă actualitate în cercetarea națională și internațională

din domeniul zootehnic, măbind contribuția românească la cercetări internaționale de vârf și implicit aplicarea unor măsuri active de conservare genetică a celor două rase de bovine.

Viabilitatea cercetărilor este garantată de actualitatea tematicii propuse iar rezultatele obținute nu răspund doar necesităților domeniului zootehnic, ci și cerințelor socio-economice prin puternicul său impact educațional, de conservare a biodiversității.

Originalitatea cercetărilor relevă din complexitatea temei abordate, precum și din următoarele aspecte de importantă științifică națională și internațională:

- analiza amplă a markerilor mitoondriali citocrom b și d-loop la rasele de bovine Sură de Stepă și Pinzgau din România;
- furnizarea unor informații noi atât pe plan național cât internațional privind structura genetică a celor două rase locale din țara noastră;
- caracterizarea biologică amplă a celor două rase de bovine, Sură de Stepă și Pinzgau, privind diversitatea genetică, originea și filogenia acestora, pornind de la cele mai vechi dovezi arheologice până la cele mai recente studii;
- sublinierea aspectelor importante legate de problematica conservării populațiilor de bovine aflate în pericol de extincție;
- analiza statistică a datelor, bazată pe utilizarea unor programe complexe de analiză a secvențelor genice, aplicate la nivelul cercetărilor de vârf;
- aplicarea metodelor de biologie moleculară în vederea caracterizării markerilor mitoondriali care conferă o valoare de mare amploare studiului, furnizând date de reper pentru studiile ulterioare cu privire la analiza genomului mitoondrial complet la bovine.

Această cercetare aduce un grad înalt de noutate, privind progresul genetic în conservarea raselor de bovine din țara noastră care s-a făcut de-a lungul timpului într-un ritm lent; analiza markerilor mitoondriali luând o mai mare amploare de scurt timp.

BIBLIOGRAFIE REFERENCES

1. Acatincăi S., 2010 - *Tehnologia creșterii bovinelor*. Editura Agroprint, Timișoara.
2. Acatincai S., 2004 - *Cattle Productions*, Editura Publishing House, Timisoara.
3. Achilli A., Olivieri A., Pellecchia M., Uboldi C., Colli L., 2008 - *Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle*. Curr Biol., Vol. 18, p. 157-158.
4. Achilli A., Bonfiglio S., Olivieri A., Malusà A., Pala M., 2009 - *The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome*. PLoS One, Vol. 4, e5753.
5. Adametz L., 1926 - *Lehrbuch der allgemeinen Tierzucht*. Springer, Wien.
6. Allchin F.R., 1963 - *Neolithic Cattle-keepers of South India: A Study of the Deccan Ashmounds*. Cambridge University Press.
7. Aleandri R., Buttazzoni L.G., Schneider J.C., Caroli A., Davoli R., 1990 - *The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese – producing ability*. Journal of Dairy Science, Vol. 73, p. 241-255.
8. Angelescu, I.; Rusu, S.; Zăbavă, I. Animal Husbandry; Editura Didactică și Pedagogică: Bucharest, Romania, 1974.
9. Antal J., 1980 - *Growth of Slovakian Pinzgau bulls from an improved population*. Journal: Pol'nohospodarstvo, Vol. 26, Nr..9 p.842-847.
10. Arif I.A., Bakir M.A., Khan H.A., 2012 - *Inferring the phylogeny of bovidae using mitochondrial DNA sequences: resolving power of individual genes relative to complete genomes*. EVol. Bioinform, Vol. 8, p. 139–50.
11. Barbara Harlizius, Tammen, I., Eichler K., Eggen A., Hetzel D.J.S., 1997 - *New markers on bovine Chromosome 1 are closely linked to the polled gene in Simmental and Pinzgauer cattle*. Mammalian Genome, Vol. 8, p. 255-257.
12. Bartosiewicz L., 1996 - *Hungarian Grey cattle: in search of origins*. Hungarian Agricultural Research, Vol. 5, p. 4–9.
13. Baumung R., Sölkner J., 2002 - *Analysis of pedigrees of Tux-Zillertal, Carinthian Blond and Original Pinzgau cattle population in Austria*. J Anim Breed Genet, Vol. 119, p. 175-181.
14. Beja-Pereira A., Caramelli D., Lalueza-Fox C., Vernesi C., Ferrand N., Casoli A., Goyache F., Royo L.J., Conti S., Lari M., Martini A., Ouragh L., Magid A., Atash A., Zsolnai A., Boscato P., Triantaphylidis C., Ploumi K., Sineo L., Mallegni F., Taberlet P., Erhardt G., Sampietro L., Bertranpetit J., Barbujani G., Luikart G., Bertorelle

- G., 2006 - *The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 21, p. 8113–8118.
15. Bellwood P., 2004 - *First Farmers* (Blackwell, Oxford).
 16. Bâlțeanu A.V., Pop F.D., Vlaic A., Carșai T.C., Creangă Șt., Rusu A.R. 2010a - *Characterization of the $\alpha S1$ casein IRV allele provides evidence for phylogeny of the ancient Romanian Grey Steppe cattle*, Moldavian strain, Vol. 53, Nr. 15, p. 167-172.
 17. Bâlțeanu A.V., Vlaic A., Șuteu M., Carsai T., 2010b - *A comparative study of major milk protein polymorphism in six Romanian cattle breed*. Bull UASVM Animal Scie Bio, Vol. 67, Nr. (1-2), p. 345-350.
 18. Bâlțeanu A.V., Vlaic A., Pop F.D., Rusu A.R., Martin P., Miranda G., Creangă Șt., 2008 - *Characterization at protein level of the new $\alpha S1$ casein allele IRV discovered in Romanian Grey Steppe cattle breed Moldavian variety*. Scientific Papers – Animal Husbandry and Biotechnology Series Timișoara, Vol. 41, Nr. 1, p. 1-10.
 19. Bâlțeanu A.V., Vlaic A., Rusu A.R., Creangă Șt., Pop F.D., Odagiu A., Pântea M.L., Hâncu V., 2007 - *Milk proteins polymorphism in Romanian Grey Steppe cattle studied by isoelectric focusing technique (IEF). Identification of a new $\alpha S1$ -casein allele: $\alpha S1$ IRV*. Bulletin USAMV-CN, Vol. 63-64, p. 304-310.
 20. Bittante G., 2011 - *Italian animal genetic resources in the domestic animal diversity information system of FAO*. Ital. J. Anim. Sci., Vol. 10, p.151–158.
 21. Bibi F., 2013 - *A multi-calibrated mitochondrial phylogeny of extant Bovidae (Artiodactyla, Ruminantia) and the importance of the fossil record to systematics*. BMC EVol Biol., Vol. 13, p. 166.
 22. Bocănici M., 2007 - *Contribuții la studiul creșterii taurinelor în exploatarea privată din bazinul Dornelor și Câmpulung Moldovenesc*. PhD Thesis, USAMV Iași., p. 88 p.
 23. Bogdanovic V., Djedovic R., Perisic P., Petrovic M. M., 2005 - *Cattle breeding goals and programmes in Serbia*. Biotechnology in Animal Husbandry, Vol. 21, Nr. (5-6), p. 15-21.
 24. Bodò I., Gera I., Koppány G., 2014 - *The Hungarian Grey cattle breed*. Budapest: Association of the Hungarian grey cattle breeders. p. 128.
 25. Bollongino R., Edwards C.J., Alt K.W., Burger J., Bradley D.G., 2006 - *Early history of European domestic cattle as revealed by ancient DNA*. Biol Lett., Vol. 2, p. 155–159.
 26. Bollongino R., Elsner J., Vigne J.D., Burger J., 2008 - *Y-SNPs do not indicate hybridisation between European aurochs and domestic cattle*. PLoS ONE, Vol. 3: e3418.
 27. Bonfiglio S., Achilli A., Olivieri A., Negrini R., Colli L., Liotta L., Ajmone-Marsan P., Torroni A., Ferretti L., 2010 - *The Enigmatic Origin of Bovine mtDNA Haplogroup R: Sporadic Interbreeding or an Independent Event of Bos primigenius Domestication in Italy?* PLoS ONE, Vol. Nr. 5 (12), p. 1-10.

28. Bradley D.G., MacHugh D.E., Cunningham P., Loftus R.T., 1996 - *Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle*. Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 93, p. 5131–5135.
29. Bradley D.G., Magee D.A., 2006 - *Genetics and origins of domestic cattle, New Genetics and Archaeological Paradigms*, University of California Press, Ltd, Berkeley, CA, p. 317–328.
30. Brenig B., 2020 - *Endangered Pinzgauer cattle subtype Jochberger Hummel are genetically distinct*. Animal Genetics. Vol. 51, p. 590–594.
31. Brisco P., Creswell D., Ekenberg S., Towne J., Holmes D., Hurst R., Mendez J., Selman S., Shultz J., Storts D., Grosch J., 1996 - *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System: The Next Generation in Miniprep Purification*. Promega Notes Magazine, Vol. 59, p. 10.
32. Bruford M.W., Townsend S.J., 2004 - *Case studies in the genetics of animal domestication*, J. Adv. Vet. Anim. Res., Vol. 1, Nr. 3, p. 86-93.
33. Caput P., Ivanković A., Konjačić M., 2004 - *Genome typing of autochthonous breeds of domestic animals in Croatia*. Stočarstvo, Vol. 58, p. 265 - 293.
34. Caroli A., Rizzi R., Lühken G., Erhardt G., 2010 - *Short communication: Milk protein genetic variation and casein haplotype structure in the Original Pinzgauer cattle*. J. Dairy Sci., Vol., 93, p. 1260–1265.
35. Carșai T.C., Vlaic A., Coșier V., Bâlțeanu A.V., 2008 - *Research on the polymorphism at the leptin gene locus for selection purposes assisted by genetic markers in cattle*. Ed. Bioflux Publishing House, Cluj-Napoca.
36. Ciupercescu D.D., Morar R., 1982 - *Genotype conservation of the Grey Cattle is an utmost necessity. The present situation of the Grey Cattle in Romania*. Symp. 29-30 Oct. 1982. Cluj-Napoca, Vol. 7, p. 403- 408.
37. Clutton-Brock J., 1990 - *The walking larder: patterns of domestication, pastoralism, and predation (one world archaeology)*. Oxford: Routledge.
38. Clutton-Brock J.A., 1999 - *Natural History of Domesticated Mammals*. Cambridge, UK, Ed. Cambridge University Press.
39. Cojocaru D.C., Sandu M., 2004 - *Biochimia proteinelor și a acizilor nucleici*. Editura PIM, Iași, p. 311-322.
40. Cotos F., 2005 - *Contributii la cunoașterea taurinelor din rasa Pinzagu*. Teza de doctorat USAMV Iasi.
41. Cotterill F. P. D., 2005 - *The Upemba lechwe, Kobus anselli: an antelope new to science emphasizes the conservation importance of Katanga*, Democratic Republic of Congo (abstract). Journal of Zoology, Vol. 265, Nr. 2, p. 113-13.
42. Creangă Șt., Dascălu D.L., Ariton A. M., 2018 - *Conservarea rasei Sură de stepă din România în vederea asigurării biodiversității resurselor genetice a populațiilor de animale*. Editura Pim, Iași. (ISBN 20978-606-13-4638-7).
43. Creangă Șt., Maciuc V., 2010 - *Rasa Sură de Stepă din Romania*. Editura Alfa Publishing House, Iași.

44. Creangă Șt., Popescu E.C., Maciuc V., 2009 - *The studs of Grey Steppe breed until now*. Lucrări științifice seria zootehnie. Vol 52, Nr. 14.
45. Creangă Șt, Maciuc V., Leonte C., 2008a - *Genetical conservation for Romanian Grey Steppe cattle breed from SCDCB Dancu, Iasi county*. Lucrări științifice, Vol. 51, Nr. 10, Seria Medicină Veterinară, USAMV Iași.
46. Creangă Șt, Maciuc V., Pîntea M., Gîlcă I., Dănăila R., 2008b - *Romanian Grey Steppe cattle breed in the context of genetic resources preservation in Romania*. 3-rd International Symposium, 18-20 September, University of Technology and Life Sciences in Bydgoszcz, Poland. Book of abstract. Journal Central European of Agriculture.
47. Creangă Șt., Dascălu D., Ruginosu E., Borș I., Ilie D.E., Cean A., 2013 - *Demographic Study on the Total Sura de Stepă Breed Population in Romania*. Cercetari agronomice in Moldova, Vol. 46, p. 85-97.
48. Curik I., Ferenčaković M., Karapandza N., Cubric - Curik V., Sölkner J., 2014 - *Estimation of inbreeding and effective population size in Istrian cattle using molecular information*. Acta Agraria Kaposváriensis, Vol 18, Nr. 1, p. 30-34.
49. Czerneková V., Kott T., Dudková G., Sztankóová, Z., Soldát J., 2006 - *Genetic diversity between seven Central European cattle breeds as revealed by microsatellite analysis*. Czech J. Anim. Sci., Vol. 51, Nr., p.1-7.
50. D'Andrea M., Pariset L., Matassino D., Valentini A., Lenstra A.J., Maiorano G., Pilla F., 2011 - *Genetic characterization and structure of the Italian Podolian cattle breed and its relationship with some major European breeds*. Italian Journal of Animal Science, Vol. 10, Nr. 54, p. 237-243.
51. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D., 2012 - *jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing*. Nature Methods, Vol. 9, Nr. 8, p. 772.
52. Dascălu L.D., Creangă Șt., Borș S.I., Ruginosu E., Postolache A.N., 2014 - *Preliminary Researches Regarding The Conservation Of Endangered Local Cattle To Be Abandoned And The Achieving Of Meat Hybrids Throughout The Hybridization With Romanian Breeds*. Cercetări Agronomice în Moldova Vol. XLVII, Nr. 3, p. 159.
53. Dascălu D.L., Creangă Șt., Borș S.I., Doliș M. Gh., Simeanu D., Donoșă R., 2017 - *The Romanian Grey Steppe characterisation – the breed evolution in the last century from the numerical and morphological point of view*. Danubian Animal Genetic Resources, Vol 2, p. 70-75.
54. Dascălu D.L., Creangă Șt., Bugeac T., Borș S.I., Ruginosu E., 2012 - *Observations on the morphoproductive characteristics of a nucleus of cattle, Grey Steppe breed*. Scientific Papers – Animal Husbandry, Iași, Vol. 58, Nr. 17, p. 166-171.
55. Davidescu M.A., Grădinaru A.C., Creangă Șt., 2019 - *Endangered Romanian cattle breeds – between traditional breeding and genetic conservation*. Proceedings Scientific Congress „Life sciences, a challenge for the future”, Filodiritto

International Proceedings, Filo Diritto Editore, p. 339-349, 17-18 October 2019, Iași, România.

56. Davidescu M., Madescu M., Ciorpac M., Dascalu L., Bugeac T., Matei A., Porosnicu I., Creanga Șt., 2020 - *Genetic diversity of Pinzgau cattle breed: a systematic review*. Scientific Papers. Series D. Animal Science. Vol. LXIII, Nr. 2, p. 78-82.

57. Dekel Y., Machluf Y., Ben-Dor S., Yifa O., Stoler A., Ben-Shlomo I., Bercovich D., 2015 - *Dispersal of an ancient retroposon in the TP53 promoter of Bovidae: phylogeny, novel mechanisms, and potential implications for cow milk persistency*. BMC Genomics, Vol. 16, Nr. 53, p. 1-12.

58. Demiguel D., Sánchez I.M., Alba D.M., Galindo J., Robles J.M., Moyà-Solà S., 2012 - *First evidence of Azanza and Morales, (Ruminantia, Bovidae), in the Miocene of the Vallès-Penedès Basin (Spain)*. Journal of Vertebrate Paleontology, Vol. 32, Nr. 6, p. 57-62.

59. Di Lorenzo P., Lancioni H., Ceccobelli S., Colli L., Cardinali I., Karsli T., Capodiferro M.R., Sahin E., Ferretti L., Marsan P.A., 2018 - *Mitochondrial DNA variants of Podolian cattle breeds testify for a dual maternal origin*. PloSone, Vol. 13.

60. Diamond J., 2002 - *Evolution, consequences and future of plant and animal domestication*. Nature, Vol. 418, p. 700-707.

61. Drabik A., Bodzoń-Kulakowska A., Silberring J., 2016 - *Gel Electrophoresis. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry* (Second Edition) The Crossroads, p. 115-143. ISBN 978-0-444-63688-1.

62. Drăgănescu C., 2006 – *Conservarea activă a rasei Pinzgau în sistemele de exploatare a vacilor din România*. Analele IBNA vol. 22, p. 59-65.

63. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A., 2012 - *Bayesian phylogenetics with Beauty and the BEAST1.7*. Mol. Biol. EVol., Vol. 29, p. 1969-1973.

64. Edwards C.J., Bollongino R., Scheu A., Chamberlain A., Tresset A., 2007 - *Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs*. Proc R Soc B., Vol. 274, p. 1377-1385.

65. Elsik C.G., Tellam R.L., Worley K.C., Gibbs R.A., Muzny D.M., Weinstock G.M., 2009 - *The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution*. Science, p. 324:522.

66. Erhardt G., 1996 - *Detection of a new κ -casein variant in milk of Pinzgauer cattle*. Anim. Genet., Vol., 27, p. 105-107.

67. Erhardt G., Juszczak, J., Panicke L., Krick-Saleck, H., 1998 - *Genetic polymorphism of milk proteins in Polish Red cattle: A new genetic variant of β -lactoglobulin*. J. Anim. Breed. Genet., Vol., 115, p. 63-71.

68. Erhardt G., Prinzenberg, E.M., Buchberger, J., Krick-Saleck, H., Krause I., Miller M., 1997 - *Bovine κ -casein G detection, occurrence, molecular genetic characterization, genotyping and coagulation properties*. Proc. IDF Milk Protein

Polymorphism Seminar II. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, p. 328–329.

69. Estes R. D., 1991 - *The Behavior Guide to African Mammals: including hoofed mammals, carnivores, primates*. Los Angeles: University of California Press.

70. Feldhamer G., Drickamer L., Vessey S., Merritt J., Krajewski C., 2007 - *Mammalogy: Adaptation, Diversity, Ecology*. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press.

71. Fernández J., Toro M. A., Caballero A., 2003 - *Fixed contributions vs. minimization of global coancestry to control inbreeding in small populations*, Genetics, Vol. 165, p. 885-894.

72. Fisteag I., 1956 - *Cercetări asupra taurinelor Pinzgau din jud. Suceava*, Analalele ICZ, Vol. IX.

73. Fisteag I., Angelescu I., Temisan V., 1958 - *Vaca de Dorna – un nou tip de taurine din Nordul țării*. Ed Agro- Silvică București.

74. Garibyan L., Avashia N., 2013 - *Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*. J Invest Dermatol, Vol. 133, Nr. 3, p. 6.

75. Gatesy J., Yelon D., DeSalle R., Vrba E.S., 1992 - *Phylogeny of the Bovidae (Artiodactyla, Mammalia), based on mitochondrial ribosomal DNA sequences*. Molecular Phylogenetics and Evolution, Vol. 9, p. 433–46.

76. Gîlcă I., Valerica Gîlcă, 2012 - *Researches regarding the performance of milk production registred in dairy breeds Pinzgau and Transilvania's Pinzgau, exploited in the North-East of Romania*. Lucrări Științifice - Seria Zootehnie, Vol. 58, p. 265-268.

77. Gelev K., 2004 - *We are obligate to conserve genetic diversity for following generations*. Animal Breeding, Vol. 5, Nr. (2–3).

78. Gentry A., 2011 - *Bovidae*, in T. Harrison, ed. *Paleontology and Geology of Laetoli: Human Evolution in Context. Fossil Hominins and the Associated Fauna*. New York, NY: Springer, Vol. 2, p. 363-465.

79. Georgescu S.E., Manea M.A., Zaulet M., Costache M., 2008 - *Genetic diversity among Romanian cattle breeds with a special focus on the Romanian Grey Steppe Breed*. Romanian Biotechnological Letters, Vol. 14, Nr. 1, p. 4194-4200.

80. Georgescu Gh., 1988 - *Tratat de creșterea bovinelor*: Vol. I. Editura Ceres, București.

81. Geraads D., El Boughabi S., Zouhri S., 2012 - *A new caprin bovid (Mammalia) from the late Miocene of Morocco*". Palaeontologica Africana, Vol. 47, p.19–24.

82. Ginja C., Penedo M.C., Melucci L., Quiroz J., Martínez López O.R., Revidatti M.A., 2010 - *Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms*. Animal Genetics, Vol. 41, p. 128–141. PMID: 19817725.

83. Giorgetti A., Sargentini C., Martini A., Tocci R., Ciani F., 2009 - *The Maremmana breed: palethnological origin and performance characteristics*. Taurus, Vol. 3, p. 142–144.
84. Götherström A., Anderung C., Hellborg L., Elburg R., Smith C., Bradley D.G., Ellegren H., 2005 - *Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe*. Proc Biol Sci, Vol. 22, Nr. 272, p. 1579-2345.
85. Gradinaru A.C., Petrescu-Mag I.V., Oroian F.C., Balint C., Oltean I., 2018 - *Milk Protein Polymorphism Characterization: A Modern Tool for Sustainable Conservation of Endangered Romanian Cattle Breeds in the Context of Traditional Breeding*. Sustainability, Vol. 10, p. 534.
86. Groeneveld L.F., Lenstra J.A., Eding H., Toro M.A., Scherf B., Pilling D., 2010 - *Genetic diversity in farm animals - a review*. Anim Genet, Vol. 41, p. 6–31. PMID: 20500753.
87. Guarcini R., 2009 - *Italian beef cattle: current and future situation*. Taurus, Vol. 3, p. 39–46.
88. Han I., Bobiş O., 2018 - *Currents and perspectives in dairy and meat cattles breeding in Romania, with emphasys on Apuseni area*. Agricultura, Nr.1 – 2, p. 139-144.
89. Harrison T., 2011 - *Paleontology and Geology of Laetoli Human Evolution in Context*. Dordrecht: Springer. p. 363–465. ISBN 978-9048-199-624.
90. Hassanin A., Ropiquet A., 2005 - *Molecular phylogeny of the tribe Bovini (Bovidae, Bovinae) and the taxonomic status of the Kouprey, Bos sauveli Urbain 1937*. Molecular Phylogenetics and Evolution, Vol. 33, Nr. 3, p. 896-907.
91. Heather J.M., Chain B. 2016 - *The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA*. Geonomics, Vol. 107, Nr. 1, p. 1-8.
92. Hernandez-Fernandez M., Vrba E.S., 2005 - *A complete estimate of the phylogenetic relationships in Ruminantia: a dated species-level super tree of the extant ruminants*. Biological Review, Vol. 80, p. 269-302.
93. Hiendleder S., Lewalski H., Janke A., 2008 - *Complete mitochondrial genomes of Bos Taurus and Bos indicus provide new insights into intraspecies variation, taxonomy and domestication*. Cytogenet Genome Res., Vol. 120, p.150–156.
94. Higgins D. G. 1994 - *CLUSTAL V: multiple alignment of DNA and protein sequences*. Methods Mol Biol, Vol. 25, p. 307-318.
95. Holló G., Nuernberg K., Somogyi T., Anton I., Holló I., 2012 - *Comparison of fattening performance and slaughter value of local Hungarian cattle breeds to international breeds*. Arch. Anim. Breed., Vol. 55, p. 1–12.
96. Ibeagha-Awemu E. M., Prinzenberg, E.-M., Jann, O. C., Lühken G., Ibeagha A. E., Zhao X., Erhardt, G., 2007 – *Molecular characterization of bovine CSN1S2B and extensive distribution of zebu specific milk protein alleles in European cattle*. J. Dairy Sci., Vol., 90, p. 3522–3529.

97. Ibrahim A., Mohammad A.B., Haseeb A.K., 2012 - *Inferring the Phylogeny of Bovidae Using Mitochondrial DNA Sequences: Resolving Power of Individual Genes Relative to Complete Genomes*. EVol Bioinform Online, Vol. 8, p. 139–150.
98. Ikonen T., Ojala M., Syväroja E.L., 1995 - *Effects of composite casein and β – lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model*. Agricultural and Food Science, Vol. 6, p. 283-294.
99. Ilie D.E., Sălăjeanu A., Magdin A., Stanca C., Vintilă I. 2008 - *Genetic polymorphism at the β - lactoglobulin locus in a dairy herd of Romanian Spotted and Brown of Maramureş breeds*, Lucrări Ştiinţifice Zootehnie şi Biotehnologii Timişoara, Vol. 41, Nr. 1, p. 104-107.
100. Ilie D.E., Creangă Şt., Grădinaru A.C., Borş S.I., Dascălu D.L., Chirilă D., Cean A., 2014 -*Genetic diversity of Romanian Grey Steppe cattle based on milk protein polymorphism*, Abstracts / Journal of Biotechnology, Vol. 185 S, p. S49.
101. Ilie D.E., Cean A., Czyszter L.T., Gavojdian D., Ivan A., Kusza S., 2015 - *Microsatellite and Mitochondrial DNA Study of Native Eastern European Cattle Populations: The Case of the Romanian Grey*. PLoS One, Vol. 10, Nr. 9.
102. Ivankovic A., Paprika S., Ramljak J., Dovc P.M.K., 2014 - *Mitochondrial DNA-based genetic evaluation of autochthonous cattle breeds in Croatia*. Czech J Anim Sci. Vol. 59, Nr. 11, p. 519.
103. Ivanković A., Caput P., Prekalj G., Kelava N., Konjačić M., Šubara G., Šuran E., 2010 - *Characteristics of the istrian cattle in beef production*. Stočarstvo, Vol., 64, Nr. 2-4, p. 91-99.
104. Kadlečík O., Kasarda R., Mészáros G., Žitný J., Vavrišínová K., 2007 - *Pedigree analysis of purebred Pinzgau population*. Acta fytotech zootech, Vol. 10, p. 29-32.
105. Kadlečík O., Kasarda R., Pavlík I., Hazuchová E., 2011 - *Pedigree Analysis of Slovak Pinzgau Breed*. Agric Conspec Sci, Vol. 76, p. 165-168.
106. Kadlecik O., Hlinku A., Lederer H. H., Grosu H., 2004 - *Development of dual-purpose Pinzgau cattle*. Editura AGRIS since, p. 132, ISBN: 80-8069-439-7.
107. Kadri K., 2019 - *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications*. Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science, Madan L. Nagpal, Oana-Maria Boldura, Cornel Baltă and Shymaa Enany, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.86491. Accesibil la: <https://www.intechopen.com/books/synthetic-biology-new-interdisciplinary-science/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-and-applications>.
108. Karatosidi D., Marsico G., Ligda C., Tarricone S., 2012 - *Assessment of the meat quality of Italian Podolian and Greek Katerini cattle*. Animal Genetic Resources, Vol. 53, p. 141 – 146.
109. Kasarda R., Kadlecik O., Mészáros G., 2008 - *Trends of endangered population of Pinzgau Cattle in Slovakia*. Archiva Zootechnica, Vol. 11, Nr. 3, p.82-87.

110. Kasarda R., Kadlecik O., Mészáros, G., 2007 b - *Possibilities of optimization of Pizgauer cattle breeding program in Slovakia*. Archiva Zootechnica, Cartea Universitara Bucuresti, Vol. 10, p. 140-145, ISSN 1016-4855.
111. Kasarda R., Kadlečík O., 2011 - *Influence of Maximum Inbreeding Avoidance under BLUP EBV Selection on Pinzgau Population Diversity*. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, Vol. 44, Nr. 1, p. 255-259.
112. Kasarda R., Nina Moravčíková, Trakovická A., Mészáros G., Kadlečík O., 2015 - *Genome-wide selection signatures in Pinzgau cattle*. Potravinarstvo, Vol. 9, Nr. 1, p. 268-274.
113. Kasarda R., Kadlečík O., 2007 a - *An economic impact of inbreeding in the purebred population of Pinzgau cattle in Slovakia on milk production traits*. Czech J Anim Sci, Vol. 52, p.7-11.
114. Kasarda R., Nina Moravčíková, Kristína Lehocká, Barbora Olšanská, Prišťák J., Anna Trakovická, Kadlečík O., 2019 - *Haplotype block structure in the genome of Slovak Pinzgau cattle*. Proceedings of the X International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2019", p. 1440-1445.
115. Kenneth K. Kiddl și Franz Pirchner, 1971 - *Genetic relationships of Austrian cattle breeds*. Anim. Blood Grps biochem. Genetics, Vol. 2, p. 145–158.
116. Keros T., Jemeršić L., Prpić J., Brnić D., 2015 - *Molecular characterization of autochthonus Slavonian Syrmian Podolian cattle*, Acta Veterinaria-Beograd, Vol. 65, Nr. 1, p. 89-98.
117. Kingdon J., 1989 - *Bovids, horned ungulates. East African mammals: an atlas of evolution in Africa*. Vol. IIIC, Editura University of Chicago Press, Chicago, p. 1–746.
118. Kübarsepp I., Henno M., Viinalass H., Sabre D., 2005 - *Effect of κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on the milk rennet coagulation properties*. Agronomy Research, Vol. 3 , Nr. 1, p. 55-64.
119. Kukučková Veronika, Moravčíková Nina, Ferenčaković M., Simčič M., Mészáros G., Sölkner J., Trakovická A., Kadlečík O., Curik I., Kasarda R., 2017 - *Genomic characterization of Pinzgau cattle: genetic conservation and breeding perspectives*. Conserv Genet., p. 1-18.
120. Kukučková Veronika, Moravčíková Nina, Trakovická Anna, Kadlečík O., Kasarda R., 2016 - *Genetic differentiation of Slovak Pinzgau, Simmental, Charolais and Holstein cattle based on the linkage disequilibrium, persistence of phase and effective population size*. Acta argiculturae Slovenica, Vol. 5, p. 37–40.
121. Kukučková Veronika, Nina Moravčíková, Curik I., Mojca Simčič, Mészáros G., Kasarda R., 2018 - *Genetic diversity of local cattle*. Vol. 65, Nr. 3, p. 421–424.
122. Kurar E., 2014 - *Genetic diversity of native Turkish cattle breeds: Mantel, AMOVA and bottleneck analysis*. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, Vol 1, Nr. 3.

123. Kushniraand A.V., Glazko V.I., 2009 - *Gray Ukrainian Cattle and Their Closely Related Forms*. Contemporary Problems of Ecology, Vol. 2, Nr. 3, p. 288–295.
124. Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.H., Kim Y.H., 2012 - *Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments*. JoVE Journal, Vol. 13, p. 213.
125. Lewin B., 2004 - *Genes VIII*. Editura Pearson Prentice Hall, p. 426-452.
126. Li J., Yang Y., Mao Z., Huang W., Qiu T., Wu Q., 2016 - *Enhanced Resolution of DNA Separation Using Agarose Gel Electrophoresis Doped with Graphene Oxide*. Nanoscale Research Letters, Vol. 11, p. 404.
127. Linnaeus C., 1758 - *The Mammalia in the 10th edition of Systema Naturae*. 10th edition of Systema Naturae.
128. Loftus R.T., MacHugh D.E., Bradley D.G., Sharp P.M., Cunningham P., 1994 - *Evidence fortwo independent domestications of cattle*. Proc Natl Acad Sci U.S.A., Vol. 91, p. 2757–61.
129. Loftus R.T., Ertugrul O., Harba A.H., El-Barody M.A., MacHugh D.E., 1999 - *A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East*. Mol Ecol., Vol. 8, p. 2015–2022.
130. Maciuc V., Radu-Rusu R.M., 2018 - *Assessment Of Grey Steppe Cattle Genetic And Phenotypic Traits As Valuable Resources In Preserving Biodiversity*, Environmental Engineering and Management, Vol. 17, Nr. 11, p. 2741-2748.
131. Maciuc V., Creangă Șt., Nacu Ghe., 2009 - *Research Regarding the Conservation of Genetic Fund Specific to Breed Sura de Stepă from Romania*. The 8th International Symposium „Prospects for the 3rd Millennium Agriculture”, U.S.A.M.V. Cluj-Napoca, Bulletin, Vol. 66, p. 1-2.
132. Maciuc V., 2006 - *Managementul creșterii bovinelor*. Editura Alfa, Iași.
133. Maciuc V., Creangă Șt., Gîlcă I., 2010a - *Contributions to the Study of Sura de Stepa Cattle Breeds*. Lucrări științifice seria zootehnie, Vol 43, p. 1-2.
134. Maciuc V., Creangă Șt., Gîlcă I., Chelmu S.S., 2010b - *Evaluation of Romanian Grey Steppe breed in the Context of Genetic Fund Preservation in Romania*. ICPD (Conference), Book of proceedings, Ghent University, Ghent, Belgium.
135. Magee D.A., MacHugh D.E., Edwards C.J., 2014 - *Skip Nav Destination Interrogation of modern and ancient genomes reveals the complex domestic history of cattle*. Animal Frontiers, Vol. 4, Nr. 3, p. 7–22.
136. Machugh D.E., Shriver M.D., Loftus R.T., Cunningham P., Bradley D.G., 1997 - *Domestication and Phylogeography of Taurine and Zebu Cattle*. Genetics, Vol. 146, p. 1071–1086.
137. Mackay I., Powell W., 2007 - *Methods for linkage disequilibrium mapping in crops*. Trends in plant science, Vol. 12, Nr. 2, p.57-63.
138. Mang N., 2011 - *Genetic Structure of Quantitative Characters in Pinzgau of Transilvania Breed from Hateg Region*. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, Vol. 44, Nr. 1, p. 432-434.

139. Mannen H., Kohno M., Nagata Y., Tsuji S., Bradley D.G., 2004 - *Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle*. Mol Phylogenet Evol. Vol. 32, p. 539–544.
140. Maretto F., Ramljak J., Sbarra F., Penasa M., Mantovani R., Ivankovic A., 2012 - *Genetic relationship among Italian and Croatian Podolian cattle breeds assessed by microsatellite markers*. Livest Sci., Vol.13, Nr. 1-3, p. 256.
141. Matiuti M., Bogdan A.T., Crainiceanu E., 2009 - *A case study of Transylvanian Pinzgau in Banat areal*. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, Vol. 42, Nr. 1, p. 169-174.
142. Matiuti M., 2005 - *Zootehnie generală și Ameliorarea animalelor*, Editura Tempus, Timisoara.
143. Matthee C.A., Davis S.K., 2001 - *Molecular insights into the evolution of the family Bovidae: a nuclear DNA perspective*. Mol Biol EVol., Vol. 18, p.1220.
144. Meadow R.H., 1993 - *Animal domestication in the Middle East: a revised view from the Eastern Margin*. In: Possehl GL, editor. *Harappan civilization: a recent perspective*. 2. rev. edition. New Delhi: American Institute of Indian Studies and Oxford & IBH Pub. Co, p. 295–321.
145. Melus V., Kasarda R., Kadlecik O.,Trakovicka A., 2009 - *Breeding potential of the Slovak Pinzgau cattle: seeking biochemical and molecular biologic traits*. Archiva Zootechnica Vol. 12, Nr. 1, p. 34-37.
146. Miyamoto M.M., Tanhauser S.M., Laipis P.J., 1989 - *Systematic Relationships in the Artiodactyl Tribe Bovini (Family Bovidae), as determined from mitochondrial DNA sequences*. Systematic Zoology, Vol. 38, p. 342.
147. Mészáros G., Fuerst C., Fuerst-Waltl B., Kadlečík O., Kasarda R., Sölkner J., 2008 - *Genetic evaluation for length of productive life in Slovak Pinzgau cattle*. Arch. Anim. Breed., Vol. 51, p. 438–448.
148. Moioli B., Napolitano F., Catillo G., 2004 - *Genetic Diversity between Piedmontese, Maremmana, and Podolica Cattle Breeds*. Journal of Heredity, Vol. 95, Nr. 3, p. 250–256.
149. Mohini J., Deshpande J.D., 2010 - *Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles And Application*. International Journal of Biomedical Research, Vol. 1, Nr. 5, p. 81-97.
150. Mullis K.B., 1990 - *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. Scientific American, Vol., 262, Nr. 4, p. 56–61.
151. Nancy S.T., 1992 - *The Polymerase Chain Reaction. Diagnostic molecular pahology*, Vol. 1, Nr. 1, p. 58-72.
152. Neov B., Teofanova D., Zagorchev L., Radoslavov G., Hristov P., 2013 - *Milk protein polymorphism in bulgarian grey cattle population*. Bulgarian Journal of Agricultural Science, Vol. 19, Nr. 2, p. 194–196
153. O'Neill C.J., Swain D.L., Kadarmideen H.N., 2010 - *Evolutionary process of Bos taurus cattle in favourable versus unfavourable environments and its*

implications for genetic selection. Special Issue: Evolution in Agro-Ecosystems, Vol. 3, Nr. 5-6, 422-433.

154. Öner Y., Yılmaz O., Eriş C., Ata N., Ünal C., Koncagül S., 2019 - *Genetic diversity and population structure of Turkish native cattle breeds*. South African Journal of Animal Science, Vol. 49, Nr. 4, p. 628-635.

155. Pariset L., Mariotti M., Nardone A., Soysal M.I., Ozkan E., Williams J.L., Dunner S., Leveziel H., Maroti-Agots A., Bodo I., Valentini A., 2010 - *Relationships between Podolic cattle breeds assessed by single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping*. Journal Of Animal Breeding And Genetics, Vol. 127, Nr. 6, p. 481-488.

156. Park S.D.E., Magee D.A., McGettigan P.A., Teasdale M.D., Edwards C.J., Lohan A.J., Murphy A., Braud M., Donoghue M.T., Liu Y., Chamberlain A.T., Rue-Albrecht K., Schroeder S., Spillane C., Tai S., Bradley D.G., Sonstegard T.S., Loftus B.J., MacHugh D.E., 2015 - *Genome sequencing of the extinct Eurasian wild aurochs, Bos primigenius, illuminates the phylogeography and evolution of cattle*. Genome Biology, Vol. 16, Nr. 234, p. 1-15.

157. Pavlík I., Sölkner J., Kadlečík O., Kasarda R., Mészáros G., Fuerst C., Fuerst, W., 2014 - *Joint genealogical analysis as a tool for diversity evaluation in Pinzgau cattle populations*. Archiv Tierzucht, Vol. 57, Nr.14, p. 1-12

158. Pellecchia M., Negrini R., Colli L., Patrini M., Milanesi E., Achilli A., Bertorelle G., Cavalli-Sforza L.L., Piazza A., Torroni A., Ajmone-Marsan P., 2007 - *The mystery of Etruscan origins: novel clues from Bos taurus mitochondrial DNA*. Proc. R. Soc. Biol. Sci., Vol. 274, p. 1175–1179.

159. Pelt-Verkuil E., Belkum A., John P., 2008 - *A brief comparison between in vivo DNA replication and in vitro PCR amplification. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Netherlands: Springer; 2008. p. 9-15.

160. Petrovic M., Bogdanovic V., Petrovic M.P., Ruzic-Muslic D., Ostojic D., 2002 - *Possibility of improvement of livestock production in hilly-mountainous region of Serbia*. Biotechnology in Animal Husbandry, Vol. 18, Nr. 5-6, p. 1-8.

161. Pitt D., Sevane N., Nicolazzi E.L., MacHugh D.E., Park S.D.E., Colli L., Martinez R., Bruford M.W., Orozco-terWenge P., 2019 - *Domestication of cattle: Two or three events?* Evolutionary Applications, Vol., 12, p. 123–136.

162. Poljak F., Ilkić J., Čuklić D., Pintiće V., Ernoić M., 2002 - *Basic external characteristics and measurements of Slavonian – Sirmian Podolian cattle*. Stočarstvo, Vol. 56, p. 105 - 116.

163. Popa R., Popa Dana, Roibu Consuela, 2013 - *Researches concerning the Romanian Pinzgau risk status evaluation*. Agricultural University - Plovdiv AGRICULTURAL SCIENCES, Vol. 5, Nr.14, p. 27-30.

164. Popa R., Popa D., Maftai M., Dronca D., Băcilă V., 2009 - *Animal biodiversity conservation, a key of sustainable agriculture. case study: the Romanian Pinzgau breed in Transilvania region*. Scientific Papers, Animal Science, Series D, vol. LV, p. 25-29.

165. Ramljak J., Ivankovic A., Veit-Kensch C.F.M., Medugorac I., 2011 - *Analysis of genetic and cultural conservation value of three indigenous Croatian cattle breeds in a local and global context*. J. Anim. Breed. Genet., Vol. 128, p. 73–84.
166. Rege J.E.O., Tawah C.L., 1999 - *The state of African cattle genetic resources II. Geographical distribution, characteristics and uses of present-day breeds and strains*. Animal genetic resources information, Vol., 26, p. 1-25.
167. Rognoni G., Pagnacco G., 1983 - *Atlante Etnografico delle popolazioni bovine allevate in Italia*. Rome: Consiglio Nazionale delle Ricerche.
168. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977 - *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A., Vol. 74, Nr. 12, p. 5463–5467.
169. Savage D.E., Russell D.E., 1983 - *Mammalian Paleofaunas of the World*. Ed. Addison-Wesley Publishing Company; Reading.
170. Scherf B.D., 2000 - *World Watch List for domestic animal diversity, 3rd edition*, FAO, Rome, available at: <http://www.fao.org/docrep/009/x8750e/x8750e00.htm> (Accessed on 23.07.2020).
171. Scheu A., Hartz S., Schmölcke U., Tresset A., Burger J., Bollongino R., 2008 - *Ancient DNA provides no evidence for independent domestication of cattle in Mesolithic Rosenhof, Northern Germany*. J Archaeol Sci., Vol. 35, p. 1257–1264.
172. Senczuk G., Mastrangelo S., Ajmone-Marsan P., Becskei Z., Colangelo P., Colli L., Ferretti L., Karsli T., Lancioni H., Lasagna E., Marletta D., Persichilli C., Portolano B., Sarti F.M., Ciani E., Pilla F., 2021 - *On the origin and diversification of Podolian cattle breeds: testing scenarios of European colonization using genome-wide SNP data*. Genetics Selection Evolution, Vol. 53, Nr. 48, p. 1-16.
173. Senczuk G., Mastrangelo S., Elena Ciani, Battaglini L., Cendron F., Roberta Ciampolini, Paola Crepaldi, Mantovani R., Graziella Bongioni, Pagnacco G., Portolano B., Rossoni A., Pilla F., Cassandro M., 2020 - *The genetic heritage of Alpine local cattle breeds using genomic SNP data*. Senczuk et al. Genet Sel Evol., p. 52:40.
174. Šidlová Veronika, Moravčíková Nina, Trakovická Anna, Ferenčaković M., Curik I., Kasarda R., 2015 - *Production type of Slovak Pinzgau cattle in respect of related breeds*. Acta fytotechn. zootechn., Vol. 18, Nr. 2, p. 25–29.
175. Šidlová Veronika, Kasarda R., Moravčíková Nina, Trakovická Anna, Ferenčaković Kadlečík O., 2014 - *Microsatellite analysis of population structure in Slovak Pinzgau cattle*. Acta Agraria Kaposváriensis, Vol. 18, Nr. 1, p. 24-29.
176. Šidlova Veronika, Radovan Kasarda, Nina Moravcikova, 2014 - *Genealogic structure of Slovak Pinzgau cattle population*. MENDELNET, p. 187-191.
177. Šidlová Veronika, Kasarda R., Nina Moravčíková, Anna Trakovická, Curik I., Ferenčaković M., 2016 - *Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Pinzgau cattle*. Journal of Central European Agriculture, Vol. 17, Nr. 2, p. 294-302.
178. Sinding M.H.S., Gilbert M.T.P., 2016 - *The Draft Genome of Extinct European Aurochs and its Implications for De-Extinction*. Open Quaternary, Vol. 2, p.7.

179. Slatkin M., 2008 - *Linkage disequilibrium, understanding the evolutionary past and mapping the medical future*. Nat. Revision Genetics, Vol. 9, p. 477-485.
180. Sölkner I., Filipcic L., Hampshire N., 2010 - *Genetic variability of populations and similarity of subpopulations in Austrian cattle breeds determined by analysis of pedigrees*. Animal Science , Vol. 67, Nr. 2, p. 249 – 256.
181. Soysal M.I., Kök S., 2008 - *The last survivors of Grey cattle resisting extinction. A case study of characteristics and sustainability of traditional systems of native Grey cattle breeds, in Olaizola*. Mediterranean livestock production: uncertainties and opportunities, Vol. 78, p. 55-63.
182. Srivastava A.K., Patel J.B., Ankuya K.J., Chauhan H.D., Pawar M.M., Gupta J.P., 2019 - *Conservation of Indigenous Cattle Breeds*. Journal of Animal Research, Vol.1, p. 01-12.
183. Stolpovskii I.A., Glazko V.I., Oblap R.V., Kushnir V.A., 1998 - *The phenotypic and genetic structure of the Ukrainian Grey breed of cattle*. Tsitologiya i Genetika, Vol., 32, Nr. 5, p. 54-66.
184. Susanne Binder, 2016 - *Genetic variability in three highly endangered cattle breeds in Austria*. Master thesis, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria.
185. Taberlet P., Valentini A., Rezaei H.R., Naderi S., Pompanon F., Negrini R., Ajmone-Marsan P., 2008 - *Are cattle, sheep, and goats endangered species?* Mol. Ecol., Vol. 17, p. 275–284.
186. Taberlet P., Coissac E., Pansu J., Pompanon F., 2011 - *Conservation genetics of cattle, sheep, and goats*. C. R. Biologies, Vol. 334, p. 247–254.
187. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013 - *MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. Molec. Bio. Ev., Vol. 30, p. 2725-2729.
188. Teneva A., Todorovska E., Tyufekchiev N., Kozelov L., Atanasov A., Foteva S., Ralcheva S., Zlatarev S., 2005 - *Molecular characterization of Bulgarian livestock genetic resources: 1. Genetic diversity in Bulgarian grey cattle as revealed by microsatellite markers*. Biotechnol. Anim. Husb., Vol. 21, p. 35–42.
189. Terefe E., Haile A., Mulatu W., Dessie T., Mwai O., 2015 - *Phenotypic characteristics and trypanosome prevalence of Mursi cattle breed in the Bodi and Mursi districts of South Omo Zone, southwest Ethiopia*. Tropical Animal Health and Production, Vol. 47, p. 485–493.
190. Thompson J. D., 1994 - *CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*, Nucleic Acids Res., Vol. 22, p. 4673-4680.
191. Torroni A., Achilli A., Macaulay V., Richards M., Bandelt H.J., 2006 - *Harvesting the fruit of the human mtDNA tree*. Trends Genet, Vol. 22, p. 339–245.

192. Troy C.S., MacHugh D.E., Bailey J.F., Magee D.A., Loftus R.T., Chamberlain A.T., 2001 - *Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle*. Nature, Vol. 410, p. 1088–1091.
193. Upadhyay M.R., Chen W., Lenstra J.A., Goderie C.R.J., MacHugh D.E., Park S.D.E., Magee D.A., Matassino D., Ciani F., Megens H.J., Arendonk J.A.M., Groenen M.A.M., 2017 - *Genetic origin, admixture and population history of aurochs (Bos primigenius) and primitive European cattle*. Heredity, Vol. 118, p. 169–176.
194. Vainas E., Belibasakiss N., Boscoss C., 1992 - *Robertsonian translocation in Sykia Chalkidiki cattle*. Theriogenology, Vol. 37, p. 1085-1089.
195. Valasek M.A., Repa J.J., 2005 - *The power of real-time PCR*. Advances in physiology education, Vol. 29, Nr. 3, p. 15.
196. Vidu L., Băcilă V., Călin I., Udrioiu A., Vladu M., 2013 - *The Importance Of Ancestral Grey Steppe Breed In Romania For Ensuring Biodiversity Cattle In South East Europe*. Analele Universității din Craiova, seria Agricultură – Montanologie – Cadastru (Annals of the University of Craiova - Agriculture, Montanology, Cadastre Series, Vol. XLIII.
197. Vigne J.D., Helmer D., Peters J., 2005 - *The First Steps of Animal Domestication. New Archaeological Approaches*, 9th ICAZ Conference, Durham, Oxbow Books, Oxford, p. 1–16.
198. Voytas D., 2001 - *Agarose Gel Electrophoresis*. Current Protocols in Molecular Biology. S.51.
199. Vlaic A. 1997 - *Genetic engineering*. Editura Promedia-Plus Publishing House, Cluj-Napoca.
200. Vrba E.S., Schaller G. B., 2000 - *Phylogeny of Bovidae based on behavior, glands, skulls, and postcrania. In Antelopes, Deer, and Relatives*. Editura New Haven & London: Yale University Press., p. 203-222.
201. Weier H.U., Gray J.W., 1988 - *A programmable system to perform the polymerase chain reaction*. DNA, Vol. 7, Nr. 6, p. 441.
202. Weigend S., Romanov M.N., 2002 - *The World Watch List for Domestic Animal Diversity in the context of conservation and utilisation of poultry biodiversity*. World's Poultry Science Journal, Vol. 58, Nr. 4.
203. Wilson D.E., Reeder D.A.M., 2005 - *Mammal Species of the World (3^a edición)*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, Vol. 2 Vol. p. 2142, ISBN 978-0-8018-8221-0.
204. Wilson D.E., Reeder D.M., 2005 - *Mammal Species of the World*. Editura Johns Hopkins University Press, Baltimore. ISBN 0-8018-8221-4.
205. Wilson D.E., Reeder D.M., 2005 - *Subfamily Cephalophinae. Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference (3rd ed)*.
206. Xuan T.P., Georgescu S. E., Manea M.A., Hermenean A.O., Costache M., 2010 - *Genetic diversity and phylogenetic relationships of Romanian cattle breeds*

inferred from cytochrome b gene partial sequences. Romanian Biotechnological Letters, Vol. 15, Nr. 2.

207. Židek R., Kasarda R., 2010 - *Distribution of genetic distance within groups with different relationship coefficient*. In Acta fytotechnica et zootechnica, Vol. 13, p. 73–76.

208. Zeder M.A., Bradley D., Emshwiller E., Smith B.D., 2006 - *Documenting Domestication New Genetic and Archaeological Paradigms*. Editura University of California Press, p. 375, ISBN: 9780520246386.

209. Zeuner F.E., 1963 - *A history of domesticated animals*. Editura Hutchison, London.

210. Zeder M.A., Emshwiller E., Smith B.D., Bradley D.G., 2006) - *Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology*, Trend Genet., Vol. 22, p. 139–155.

211. Zsolnai A., Maróti-Agóts A., Kovács A., Bâlțeanu A.V., Kaltenecker E., Anton I., 2020 - *Genetic position of Hungarian Grey among European cattle and identification of breed-specific markers*. Animal, Vol. 14, Nr. 9, p. 1786 – 1792.

❖ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - National Center for Biotechnology Information, accesat la data de [23.10.2019]

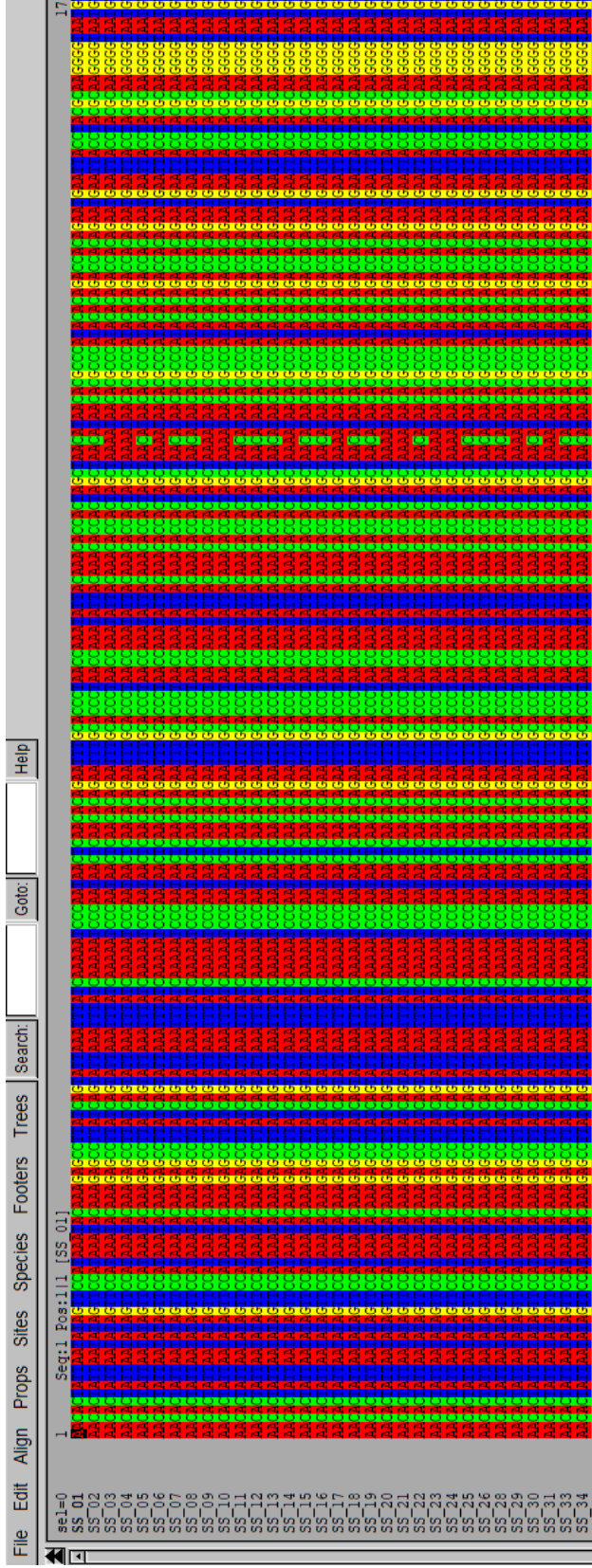
❖ <https://www.ensembl.org/index.html> - accesat la data de [19.03.2020]

❖ <https://www.promega.ro/resources/protocols/technical/manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol>, accesat la data de [25.04.2020]

❖ <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet>, accesat la data de [26.04.2020]

ANEXA II

Alinirea secvențelor genice ale d-loop în programul SeaView



LISTĂ ABREVIERI

- ✓ SS – Sură de Stepă/Grey Steppe
- ✓ P – Pinzgau/Pinzgauer
- ✓ Cyt B – citocrom b/cytochrome b
- ✓ d-loop – regiune de control mitocondrial/mitochondrial control region
- ✓ S.C.D.C.B., Dancu – Stațiunea de Cercetare – Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor, Dancu/ Research and Development Station for Cattle Breeding Dancu, Iasi
- ✓ S.C.D.C.B., Târgu-Mureș – Stațiunea de Cercetare – Dezvoltare pentru Creșterea Bovinelor, Târgu-Mureș/ Research and Development Station for Cattle Breeding, Târgu-Mureș
- ✓ ADN – acid dezoxiribonucleic/deoxyribonucleic acid
- ✓ ARN – acid ribonucleic/ribonucleic acid
- ✓ ADNmt – acid dezoxiribonucleic mitocondrial/mitochondrial deoxyribonucleic acid
- ✓ A – bază azotată, adenină/nitrogenous base, adenine
- ✓ T – bază azotată, timină/nitrogenous base, thymine
- ✓ C – bază azotată, citozină/nitrogenous base, cytosine
- ✓ G – bază azotată, guanină/nitrogenous base, guanine
- ✓ SNP - Single-nucleotide polymorphism (Polimorfisme de nucleotide unice)
- ✓ EDTA - Acid etilendiaminotetraacetic/Ethylenediaminetetraacetic acid
- ✓ F.A.O. – Food and Agriculture Organization (Organizația pentru Alimentație și Agricultură)
- ✓ PCR – Polymerase chain reaction (Reacție de polimerizare în lanț)
- ✓ IEF - Isoelectric focusing (Focalizare izoelectrică)
- ✓ N.C.B.I. - Centrul Național pentru Informații despre Biotehnologie/National Center for Biotechnology Information

LISTA FIGURILOR

Figura 1.1. Date arheologice cu privire la domesticirea bovinelor, ovinelor și caprinelor	28
Figura 1.2. Analiza filogenetică a taurinelor pe baza secvențelor de ADNmt	29
Figura 1.3. Arborele secvențelor complete ale ADNmt la bovine	30
Figura 1.4. Analiza filogenetică între <i>B. taurus</i> , <i>B. indicus</i> și <i>B. primigenius</i> pe baza algoritmului Neighbor – Joining	31
Figura 1.5. A. Arbore filogenetic reprezentând 11 specii: două subfamalii și șapte triburi aparținând familiei <i>Bovidae</i> și respectiv două familii de rumegătoare folosite ca out-grupuri (girafă și căprioară) B. Sistematica familiei <i>Bovidae</i>	33
Figura 2.1. Analiza relațiilor filogenetice dintre rasele de bovine podolice și taurinele din zonele Africii și Asiei	36
Figura 2.2. Analiza distribuțiilor de frecvență ale haplogrupurilor mitocondriale pentru 18 rase podolice (P, subliniate) și 9 rase non-podolice (non-P)	37
Figura 2.3. Rasele de bovine podolice din zona Europei de Est	38
Figura 2.4. Rasele de bovine podolice din zonele Italia și Istria	40
Figura 2.5. Rasele de bovine podolice din regiunile Balcani și Anatolia	41
Figura 2.6. Arborele filogenetic al raselor de bovine podolice	43
Figura 2.7. Descrierea varietăților de Sură de Stepă întâlnite în România	45
Figura 2.8. Analiza filogenetică a cinci rase de bovine din România	47
Figura 2.9. Arbore filogenetic construit pe distanțe genetice - Nei, metoda UPGMA	49
Figura 3.1. Distribuția numerică a populațiilor de bovine din rasa Sură de Stepă (nr. indivizi/țară)	53
Figura 4.1. Exemplare din cadrul nucleului de bovine din rasa Sură de Stepă, aflat în conservare în cadrul S.C.D.C.B., Dancu-Iași	61
Figura 4.2. Exemplare din cadrul nucleului de bovine din rasa Pinzgau, aflat în cadrul S.C.D.C.B., Târgu-Mureș	62
Figura 4.3. Imagini din cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară al Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași	62
Figura 4.4. Secvențiator din cadrul Laboratorului de secvențiere, Macrogen-Europe, Olanda	63
Figura 5.1. Materialul biologic de la care au fost recoltate probele A. Sura de Stepă; B. Pinzgau	66
Figura 5.2. Media de vârstă a exemplarelor din rasele de bovine Sură de Stepă și Pinzgau analizate	68
Figura 5.3. Distribuția numerică în funcție de vârstă a exemplarelor din rasele de bovine Sură de Stepă (a) și Pinzgau (b)	69
Figura 5.4. Recoltarea probelor de sânge în eprubete cu EDTA	70
Figura 5.5. Pregătirea cartușelor pentru extracția ADN-ului cu echipamentul Maxwell LEV Blood DNA kit	72

Figura 5.6. Pregătirea probelor și a echipamentului Maxwell 16 LEV pentru extracția ADN-ului genomic total	72
Figura 5.7. Cuantificarea probelor de ADN cu spectrofotometrul Nanodrop, ASP-3700.....	73
Figura 5.8. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) a. Denaturare ADN; b. Aliniere primeri; c. Elongare.....	75
Figura 5.9. Sistem de electroforeză în gel de agaroză	77
Figura 5.10. Principiul metodei Sanger de secvențiere a ADN-ului.....	81
Figura 5.11. Flourograma parțială a secvenței genei citocrom b, la individul SS_03	82
Figura 5.12. Flourograma parțială a secvenței genice d-loop, la individul P_14.....	82
Figura 6.1. Numărul de indivizi din rasa Sură de Stepă în România (1860 - 1996).....	86
Figura 6.2. Numărul de indivizi din rasa Sură de Stepă în România (1986 - 1996).....	86
Figura 6.3. Expansiunea demografică a populației de bovine din rasa Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu-Iași, în perioada 1990-2020 - A - Dimensiunea populației; B – Numărul de indivizi născuți/an; C - Numărul de indivizi morți/an; D – Vârsta medie a părinților; E – Structura de vârstă pentru toți indivizii analizați; F - Structura de vârstă pentru toți indivizii în viață.....	89
Figura 6.4. Evaluarea diversității genetice a populației din rasa Sură de Stepă pe baza datelor din pedigree	92
Figura 6.5. Reprezentarea grafică a valorilor concentrației ADN-ului, măsurate cu spectrofotometrul Nanodrop ASP-3700– rasa Sură de Stepă (ng/μl)	96
Figura 6.6. Valoarea medie a concentrației ADN-ului extras, în raport cu valorile minimă/maximă (ng/μl).....	97
Figura 6.7. Distribuția procentuală a probelor în acord cu valoarea raportului absorbanțelor A260/A280	97
Figura 6.8. Programul PCR_Sură de Stepă, amplificare citocrom b	99
Figura 6.9. Optimizare program PCR_Sură de Stepă, amplificare citocrom b	101
Figura 6.10. Programul PCR_Sură de Stepă, amplificare d-loop (SS-01...SS-04)	102
Figura 6.11. Programul PCR_Sură de Stepă, amplificare d-loop (SS-05...SS-34)	103
Figura 6.12. Electroforeza produșilor PCR pentru gena citocrom b la indivizii din rasa Sură de Stepă (probele SS_01...SS_04)	104
Figura 6.13. Gradient temperatură Sură de Stepă (probele SS_01...SS_04).....	105
Figura 6.14. Electroforeza produșilor PCR pentru gena citocrom b la indivizii din rasa Sură de Stepă (probele SS_01...SS_16)	106
Figura 6.15. Electroforeza produșilor PCR pentru gena citocrom b la indivizii din rasa Sură de Stepă (probele SS_17...SS_34)	106
Figura 6.16. Electroforeza produșilor PCR pentru regiunea de control mitocondrial d_loop la indivizii din rasa Sură de Stepă (primeri utilizați: BRS-F, RBIS-R) (probele SS_01...SS_04)	107
Figura 6.17. Electroforeza produșilor PCR pentru d_loop la indivizii din rasa Sură de Stepă (probele SS_05...SS_22).....	108
Figura 6.18. Electroforeza produșilor PCR pentru d_loop la indivizii din rasa Sură de Stepă (probele SS_23...SS_34).....	108

Figura 6.19. Frecvența haplotipurilor în populația de bovine din rasa Sură de Stepă	109
Figura 6.20. Reprezentarea grafică a frecvenței bazelor azotate pentru secvențele SS_citocrom b și SS_d_loop	111
Figura 6.21. Concentrațiile de baze azotate ale secvențelor pentru gena citocrom b a. adenină-A; b. timină-T; c. citozină-C; d. guanină-G	113
Figura 6.22. Concentrațiile de baze azotate ale secvențelor pentru regiunea de control mitocondrial d-loop a. adenină-A; b. timină-T; c. citozină-C; d. guanină-G	115
Figura 6.23. Rețeaua de haplotipuri a indivizilor din populația de bovine Sură de Stepă a. citocrom b; b. d-loop.....	118
Figura 6.24. Arborele filogenetic obținut pe baza analizei genei citocrom b și estimarea timpului de divergență din cadrul populației de bovine Sură de Stepă.....	121
Figura 6.25.a. Ratele de substituție pentru fiecare nucleotidă, calculate în jModelTest pentru un set de 32 secvențe ale genei citocrom b provenite de la indivizi aparținând rasei de bovine Sură de Stepă; b. Ratele de substituție pentru fiecare nucleotidă, calculate în jModelTest pentru un set de 32 secvențe ale genei d-loop provenite de la indivizi aparținând rasei de bovine Sură de Stepă.	123
Figura 6.26. Arbore filogenetic realizat pe baza analizei secvențelor genice ale citocromului b, pentru populația de bovine Sură de Stepă.....	125
Figura 6.27. Arbore filogenetic realizat pe baza analizei secvențelor genice ale d-loop, pentru populația de bovine Sură de Stepă.....	126
Figura 6.28. Expansiunea demografică pentru populația Sură de Stepă, a. citocrom b; b. d-loop	127
Figura 6.29 a. Distanța între nucleotide (citocrom b, Sură de Stepă); b. Distanța între nucleotide (d-loop, Sură de Stepă).....	128
Figura 7.1. Valorile concentrației ADN-ului extras, măsurate cu spectrofotometrul Nanodrop ASP-3700 (ng/μl) – rasa Pinzgau	132
Figura 7.2. Comparatie între valoarea medie a concentrației ADN-ului, în raport cu valorile minimă/maximă (ng/μl).....	132
Figura 7.3. Distribuția procentuală a probelor în acord cu valoarea raportului absorbantelor A260/A280	133
Figura 7.4. Programul PCR_Pinzgau, amplificare citocrom b	134
Figura 7.5. Programul PCR_Pinzgau, amplificare d-loop	135
Figura 7.6. Electroforeza produșilor PCR pentru gena citocrom b la indivizii din rasa Pinzgau (probele P_01...P_24)	136
Figura 7.7. Electroforeza produșilor PCR pentru gena d-loop la indivizii din rasa Pinzgau (probele P_01...P_21)	137
Figura 7.8. Electroforeza produșilor PCR pentru gena d-loop la indivizii din rasa Pinzgau (probele P_22...P_24)	137
Figura 7.9. Frecvența haplotipurilor pentru indivizii din rasa Pinzgau analizați	138
Figura 7.10. Reprezentarea valorilor frecvențelor bazelor azotate pentru secvențele P_citocrom b și P_d_loop	140

Figura 7.11. Concentrațiile de baze azotate ale secvențelor pentru gena citocrom b-Pinzgau a. adenină-A; b. timină-T; c. citozină-C; d. guanină-G.....	142
Figura 7.12. Concentrațiile de baze azotate ale secvențelor pentru regiunea de control mitocondrial d-loop-Pinzgau	144
Figura 7.13. Rețeaua de haplotipuri a indivizilor din rasa Pinzgau, rezultată prin analiza secvențelor citocrom b și d-loop.....	148
Figura 7.14. Arborele filogenetic construit prin analiza secvențelor genei citocrom b și estimarea timpului de divergență în cadrul rasei Pinzgau.....	150
Figura 15.a. Ratele de substituție pentru nucleotide, calculate cu jModelTest pentru un set de 24 secvențe ale genei citocrom b provenite de la indivizi aparținând rasei de bovine Pinzgau; b. Ratele de substituție pentru fiecare nucleotidă, calculate în jModelTest pentru un set de 24 secvențe ale genei d-loop provenite de la indivizi aparținând rasei de bovine Pinzgau	152
Figura 7.16. Arbore filogenetic realizat pe baza analizei secvențelor genice ale citocromului b, pentru indivizii din rasa Pinzgau	153
Figura 7.17. Arbore filogenetic realizat pe baza analizei secvențelor genice ale d-loop, pentru rasa Pinzgau.....	154
Figura 7.18. Expansiunea demografică pentru indivizii din rasa Pinzgau (a. citocrom b; b. d- loop).....	155
Figura 7.19. a. Distanța între nucleotide (citocrom b, Pinzgau); b. Distanța între nucleotide (d-loop, Pinzgau)	156

LISTA TABELELOR

Tabelul 2.1. Diferențe morfologice ale diferitelor varietăți din rasa Sură de Stepă.....	46
Tabelul 3.1. Clasificarea populațiilor de animale după dimensiunea numerică și statusul de risc	52
Tabelul 3.2. Distribuția numerică a populațiilor din rasa Sură de Stepă din Europa în acord cu statusul de risc.....	53
Tabelul 3.3. Efectivul populațiilor din rasa Pinzgau la nivel internațional și statusul de risc	56
Tabelul 3.4. Diferențe morfologice ale diferitelor varietăți din rasa Pinzgau.....	57
Tabelul 5.1. Date de identificare ale indivizilor din rasa Sură de Stepă de la care s-a recoltat material biologic în scopul efectuării analizelor genetice.....	66
Tabelul 5.2. Date de identificare ale indivizilor din rasa Pinzgau de la care s-a recoltat material biologic în scopul efectuării analizelor genetice.....	67
Tabelul 6.1. Cuantificarea spectrofotometrică a ADN-ului total extras din probe de sânge recoltate de la rasa de bovine Sură de Stepă	95
Tabelul 6.2. Caracteristicile perechilor de primeri utilizați pentru amplificarea secvențelor genice de interes prin PCR	98
Tabelul 6.3. Componentele mediului de reacție, pentru optimizarea PCR, amplificare citocrom b, (probe SS-01...SS-04).....	99
Tabelul 6.4. Componentele mediului de reacție, necesare pentru optimizarea reacției PCR (Cyt-B, probele SS-01...SS-04)	100
Tabelul 6.5. Componentele mediului de reacție necesare pentru amplificarea PCR (citocrom b, probe SS-01...SS-34)	101
Tabelul 6.6. Componentele mediului de reacție necesare pentru reacția PCR (d-loop, probele SS-01...SS-04)	102
Tabelul 6.7. Componentele mediului de reacție necesare pentru reacția PCR-set nou primeri (d-loop, SS-01...SS-04).....	103
Tabelul 6.8. Componentele mediului de reacție necesare pentru PCR-set nou primeri (d-loop, probe SS-05...SS-34)	103
Tabelul 6.9. Frecvența bazelor azotate pentru secvențele SS_citocrom b și SS_D-loop...	110
Tabelul 6.10. Proporția bazelor azotate pentru indivizii din rasa Sură de Stepă (citocrom b).....	111
Tabelul 6.11. Proporția bazelor azotate pentru indivizii din rasa Sură de Stepă (d_loop).	113
Tabelul 6.12. Coeficientul de specificitate al indivizilor din rasa Sură de Stepă (citocrom b).....	116
Tabelul 6.13. Coeficientul de specificitate al indivizilor din rasa Sură de Stepă (d_loop)	116
Tabelul 6.14. Haplotipurile identificate și indivizii reprezentanți pentru fiecare haplotip la rasa Sură de Stepă.....	119

Tabelul 6.15. Modelul optim de substituție calculat în programul JModelTest (citocrom b și d_loop).....	122
Tabelul 6.16. Numărul de situsuri și raportul Tr/Tv pentru secvențele genice studiate	123
Tabelul 7.1. Cuantificarea spectrofotometrică a ADN-ului total extras din probe de sânge, rasa de bovine Pinzgau	131
Tabelul 7.2. Componentele mediului de reacție necesare pentru PCR, amplificare citocrom b, (probele P-01...P-24).....	134
Tabelul 7.3. Componentele mediului de reacție necesare pentru PCR, amplificare d-loop, (probele P-01...P-24).....	135
Tabelul 7.4. Valorile frecvențelor bazelor azotate pentru secvențele P_citocrom b și P_d-loop	139
Tabelul 7.5. Proporțiile bazelor azotate pentru indivizii din rasa Pinzgau (secvența citocrom b).....	140
Tabelul 7.6. Proporțiile bazelor azotate pentru indivizii din rasa Pinzgau (secvența d-loop).....	142
Tabelul 7.7. Coeficientul de specificitate al indivizilor din rasa Pinzgau (citocrom b)	145
Tabelul 7.8. Coeficientul de specificitate al indivizilor din rasa Pinzgau (d-loop).....	146
Tabelul 7.9. Haplotipurile identificate și indivizii reprezentanți pentru fiecare haplotip, la rasa Pinzgau.....	147
Tabelul 7.10. Numărul de situsuri și raportul Tr/Tv pentru secvențele genice studiate-rasa Pinzgau	151

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN CALITATE DE AUTOR PRINCIPAL - 15:**COTATE/INDEXATE ISI**

1. **Madalina Alexandra DAVIDESCU**, Mitică CIORPAC, Șteofil CREANGA, **2021** - *Highly effective method of DNA extraction from blood: a first step for analysis of genetic diversity of indigenous cattle breeds*, Scientific Papers. Series D. Animal Science, (acceptată spre publicare).

2. **Mădălina Alexandra DAVIDESCU**, A.C. Grădinaru, Șt. Creangă, **2020** - *Genetic markers associations in endangered cattle breeds to resistance on environmental conditions*. 5th International Conference on Chemical Engineering. Book of Abstract, p. 76, (acceptată spre publicare).

3. **Mădălina Alexandra DAVIDESCU**, Andrei C. Grădinaru, Mitică Ciorpac, Mădălina E. Henea, Șteofil Creangă - *Genetic Markers in the Study of Threatened with Extinction Cattle Breeds*, **2020**. European Biotechnology Congress 2020, Journal homepage Biotechnology & Biotechnological Equipment, Vol. 35. p. 102. **I.F. 1.186**.

4. **Mădălina Alexandra DAVIDESCU**, Bianca Mădescu, Mitică Ciorpac, Lucian Dascălu, Teodor Bugeac, Andrei Matei, Ioana Poroșnicu, Șteofil Creangă, **2020** - *Genetic diversity of Pinzgau cattle breed: A systematic review*. Scientific Papers. Series D. Animal Science, Vol. LXIII, Nr. 2, p. 78-84.

5. **Mădălina-Alexandra DAVIDESCU**, Șt. Creangă, R.M. Radu-Rusu, **2019** - *Research on Enzymatic Methods Used in the Validation of the Heat Treatment Processes Applied to Sour Cream, Raw Material for Butter*. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, Vol. 52 (1), ISI Proceedings. **(Premiu I)**

6. **Mădălina-Alexandra DAVIDESCU**, Grădinaru A.C., Creangă Șt., **2019** - *Endangered Romanian Cattle Breeds – Between Traditional Breeding and Genetic Conservation*. Proceedings of the International Scientific Congress “Life sciences, a challenge for the future”, Filodiritto Editore – Proceedings, Iasi, p. 339-349. **(Premiu I)**

(BDI)

7. **Mădălina Alexandra DAVIDESCU**, Mădescu Bianca Maria, Matei A.C., Creangă Șt., **2019** The quality indicators of raw milk produced from a cattle farm in Iasi county. Annals of the University of Craiova, Vol. XXIV (LX), p. 360-366.

8. **Mădălina Alexandra DAVIDESCU**, Bianca Maria Mădescu, Andrei Cristian MATEI, Șteofil Creangă, **2020** - *Study On the phylogenetic analysis of endangered romanian cattle Breeds: Grey Steppe and Pinzgau*. The 19th International Conference “Life Sciences for Sustainable Development”, Book of Abstract, p. 262.

9. **Madalina Alexandra DAVIDESCU**, Bianca M. Mădescu, Andrei C. Matei, Ioana Poroșnicu, Andra S. Neculai-Văleanu, Mitică Ciorpac, Steofil Creangă, **2020** - *Genetic Markers Used in Molecular Phylogeny Studies, Research on Endangered Cattle Breeds*. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, Vol 53 (2), p. 84-87.
10. **Mădălina Alexandra DAVIDESCU**, C-tin Pascal, A.C. Grădinaru, D. Simeanu, V. Maciuc, Șt. Creangă, **2020** - *Analytical methods based on mass spectrometry used in genomic, proteomic and metabolomic studies*. Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice - Seria Zootehnie, Vol. 74, p. 10-14.
11. **Mădălina Alexandra DAVIDESCU**, Grădinaru C.A., Ilie E. Daniela, Ivancia Mihaela, Creangă Șt., **2020** – *Blood DNA extraction for genetic analysis in endangered Romanian Grey cattle*. Scientific Papers- Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice - Seria Zootehnie, Vol. 75, p.119-122.
12. **Mădălina Alexandra DAVIDESCU**, Pascal C-tin, Ciorpac M., Mădescu M. Bianca, Neculai-Văleanu A. Sabina, Poroșnicu Ioana, Matei A.C., Creangă Șt., **2020** - *Analysis methods used in genomics research on cattle breeds*. Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice - Seria Zootehnie, vol. 75, p. 123-127.
13. **Madalina Alexandra DAVIDESCU**, Șteofil Creangă, Mădălina Elena Henea, Andrei Cristian Grădinaru, **2020** - *Agriculture and milk production in Romania - retrospectives and trends in the European context*. AAB Bioflux, Vol. 12, Issue 2, p. 58-66.
14. **Mădălina Alexandra DAVIDESCU**, Andrei C. Grădinaru, Constantin Pascal, Daniel Simeanu, Vasile Maciuc, Mihaela Ivancia, Steofil Creanga, **2021** - *Analysis of the Mitochondrial Genome in Podolian Cattle Breeds*. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies. (acceptată spre publicare).
15. **Madalina Alexandra DAVIDESCU**, Mitică Ciorpac, Bianca Maria Mădescu, Ioana Poroșnicu, Steofil Creangă, **2021** - *Analysis of the Genetic Diversity of Endangered Cattle Breeds Based on Studies of Genetic Markers*. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies. (acceptată spre publicare).

LUCRĂRI PUBLICATE ÎN CALITATE DE COAUTOR - 24:

INDEXATE ISI

1. Andrei-Cristian MATEI, Nicolae BĂDILAȘ, **Mădălina-Alexandra DAVIDESCU**, Ioana POROSNICU, Bianca Maria MĂDESCU, **2020** - *Research on the impact of the adding the apple vinegar in ration of the heavy lambs and monitorizing the ruminal ph and average daily gain*. Scientific Papers. Series D. Animal Science, Vol. LXIII, Nr. 1, p. 156-160.
2. Ioana Poroșnicu, Roxana Rațu, **Mădălina Davidescu**, Bianca Mădescu, Andrei Matei, Șteofil Creangă, Marius Usturoi, **2020** - *Researches on the quality*

assessment of Mozzarella cheese for the safety of use. Scientific Papers. Series D. Animal Science, Vol. LXIII, Nr. 2, p. 370-376.

3. Nicolae-Iulian Bădilaș, Andrei-Cristian Matei, Ioana Poroșnicu, Bianca-Maria Mădescu, **Mădălina-Alexandra Davidescu**, Benone Păsărin, **2020** - *Determination of the physico-chemical, microbiological and parasitological parameters of frozen fish, marketed by a commercial company from the northeast of Romania*. Scientific Papers. Series D. Animal Science, Vol. LXIII, Nr. 2, p. 501-506.

4. Andrei-Cristian Matei, Șteofil Creangă, **Mădălina-Alexandra Davidescu**, Bogdan-Iosif Doboș, Ioana Porosnicu, Bianca-Maria Mădescu, **2020** - *Research on the economic efficiency of farms in the function of the milking system*. Scientific Papers. Series D. Animal Science, Vol. LXIII, Nr. 2, p. 296-300.

(ISI PROCEEDINGS)

5. Neculai-Văleanu Sabina, Arion Adina-Mirela, Matei Andrei-Cristian, Mădescu Bianca-Maria, **Davidescu Mădălina-Alexandra**, Poroșnicu Ioana, Creangă Șteofil, **2019** - *Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Curcuma Longa Plant Extract and their Possible Applications*. PROCEEDINGS OF THE International Scientific Congress "Life sciences, a challenge for the future", Filodiritto Editore – Proceedings, Iasi, p. 288-293.

(BDI-Baze de date internaționale)

6. S.I. Borș, Șt. Creangă, D.L. Dascălu, Elena Ruginosu, **Mădălina Alexandra Davidescu**, Alina Borș, I. Ibănescu, **2017** - *În vitro production of embryos at research and development station for cattle breeding Dancu, Iasi – first bovine embryos produced in vitro in northeastern Romania*. Cercetări agronomice în Moldova, p-ISSN:0379-5837, e-ISSN: 2067-1865, Vol.4, p. 172.

7. Elena Ruginosu, S.I. Borș, Șt. Creangă, D.L. Dascălu, **Mădălina Alexandra Davidescu**, **2017**- *Searches on the application of a method of induction and synchronization of estrus in cows postpartum based on two doses of GnRH and prostaglandin F2 α , with programmed insemination*, Lucrări Științifice Vol. 60, p. 47-56.

8. Sabina Andra Neculai-Văleanu, D. L. Dascălu., Adina Mirela Arion, **Mădălina Alexandra Davidescu**, Elena Ruginosu, G. Nacu, Șt. Creangă, **2016** - *Dynamic of the sperm DNA integrity in frozen-thawed semen from endangered Grey Steppe breed bulls*. Lucrări Științifice Seria Zootehnie, Vol. 66, p. 132-135.

9. Șt. Creangă, – C. Șonea, – D. Simeanu, – M. Gh. Doliș, – C. Cumpănășoiu, S.I. Borș, C. Radu, **Mădălina Alexandra Davidescu**, Ioana Crivei, Cătălina Sănduleanu, D.L. Dascălu, **2018** - *Research regarding the corporal development of young calves belonging to Grey steppe breed, as viable perspective for orientation of those breed to meat production*, Danubian Animal Genetic Resources, Vol. 3, p. 26-32.

10. D.L. Dascălu, Șt. Creangă, S.I. Borș, Elena Ruginosu, V. Vintilă, **Mădălina Alexandra Davidescu**, Cătălina Sănduleanu, Ioana Crivei – **2018** -

Conservation of the Grey steppe, endangered breed, a national priority for ensuring the genetic diversity of animal populations for scientific, economic, cultural and tourist purposes. Simpozion Științific S.C.D.C.B. Tg. Mureș,

11. Ruginosu Elena, Creangă Șt., Dascălu D.L., **Mădălina Alexandra Davidescu**, Ioana Crivei, Cătălina Sanduleanu, Borș S.I., **2018** - *Preliminary results regarding estrus synchronization in postpartum dairy cows with GNRH analogue, prid – intravaginal device and pgf2 α , followed by artificial insemination at estrus detection.* Lucrări Științifice. Medicină Veterinară, Vol. 70 (23), p. 7-12.

12. Mădescu Bianca Maria, Lazăr Roxana, Creangă Șt., **Davidescu Mădălina Alexandra**, Matei A.C., Boișteanu P.C., **2019** - *Research on the evaluation of metabolic lipidic parameters for the “Romanian Spotted” cattle breed in different physiological states*, Annals of the University of Craiova, vol. XXIV (LX), p. 388-394.

13. Bianca-Maria Mădescu, A.C. Matei, Elena Ruginosu, **Mădălina-Alexandra Davidescu**, V. Vintilă, M. Amarandei, Șt. Creangă, **2019** - *Nutrigenomics, a new direction for dairy cows: A review*, Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice - Seria Zootehnie, Vol. 72, p. 67-76.

14. Bianca M. Mădescu, Roxana Lazăr, Șteofil Creangă, Andrei C. Matei, **Mădălina Alexandra Davidescu**, Paul C. Boișteanu, **2020** - *Research on the digestibility of the total mixed ration in the case of two breeds of cattle. The 19th International Conference” Life Sciences for Sustainable Development”*, Book of abstract, p. 265.

15. Bianca Maria Mădescu, Andra Sabina Văleanu, **Mădălina Alexandra Davidescu**, Ioana Poroșnicu, Andrei Cristian Matei, Șteofil Creangă, **2020** - *Research on the assessment and quality control of maize silage, produced and used in the Research-Development Station for Cattle Breeding Dancu, Iași.* Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, Vol 53 (2), p. 207-211.

16. Ioana Poroșnicu, Nicolae Bădilaș, Bianca Maria Mădescu, **Mădălina Alexandra Davidescu**, Andrei Cristian Matei, Andra Sabina Neculai-Văleanu, Șteofil Creangă, **2020** - *Research on the degree of fungal contamination of corn silage and corn grains.* Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, Vol 53 (2), p. 212-216.

17. Andrei Cristian Grădinaru, Oana Raluca Strugaru, **Madalina Alexandra Davidescu**, **2020** - *Investigations on milk quality management by risk assessment within the HACCP system.* ABAH Bioflux, 2020, Vol. 12 (1), p. 20-25.

18. Andrei Cristian Grădinaru, **Madalina Alexandra Davidescu**, Ioan Valentin Petrescu-Mag, **2020** - *DNA methylation -a common denominator in transcriptional repression, genome imprinting, X-inactivation, and carcinogenesis.* Human & Veterinary Medicine International Journal of the Bioflux Society, Vol. 12 (4), p. 193-197.

19. Sabina A. Neculai-Văleanu, M. Ciorpac, **Mădălina Alexandra Davidescu**, Bianca M. Mădescu, Ioana Poroșnicu, A.C. Matei, Șt. Creangă, **2020** - *Heat shock proteins expression in association with thermal stress in cattle breeds.* Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice - Seria Zootehnie, Vol. 74, p. 8-9.

20. Poroșnicu Ioana, Mădescu Bianca-Maria, **Davidescu Mădălina Alexandra**, Bădilaș N.I., Matei A.C., Neculai-Văleanu Andra Sabina, Creangă Șt., **2020** - *General information on the influence of the genera aspergillus, penicillium and fusarium on plant substrates: a review*. Scientific Papers-Animal Science Series: Lucrări Științifice - Seria Zootehnie, (acceptată spre publicare).
21. Mădescu Bianca Maria, Lazăr Roxana, **Davidescu Mădălina Alexandra**, Poroșnicu Ioana, Andra-Sabina Neculai-Văleanu, Matei Andrei-Cristian, Boișteanu Paul Corneliu, **2020** - *Research on the peculiarities of digestion in ruminants*. Annals of the University of Craiova, Vol. XXV (LXI), p. 409-414.
22. Poroșnicu Ioana, Bădilaș Nicolae, Mădescu Bianca, **Davidescu Mădălina Alexandra**, Matei Andrei-Cristian, Neculai-Văleanu Andra-Sabina, Creangă Șteofil, **2020** - *Contamination with fungi and mycotoxins of some vegetal substrates used in animal feed*. Annals of the University of Craiova, Vol. XXV (LXI), p. 505-509.
23. Ioana Poroșnicu, Nicolae I. Bădilaș, **Mădălina Alexandra Davidescu**, Bianca M. Mădescu, Ioan Coman, **2021** - *Contamination of Plant Substrates Evaluated by Mycological and Mycotoxicological Investigations*. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 2021, Vol. 54 (1), p. 143.149.
24. Bianca-Maria Mădescu, Roxana Lazăr, **Mădălina-Alexandra Davidescu**, Ioana Poroșnicu, Paul Corneliu Boișteanu, **2021** - *Research on hematological parameters in Aubrac cattle breed exploited on the conditions of Romania*. Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, (acceptată spre publicare).

MEMBRĂ ÎN PROIECTE DE CERCETARE

1. **Program sectorial ADER 2015-2018, Contract nr. 5.2.2./30.10.2015 (2015-2018)**, “*Conservarea și prezervarea taurinelor pe cale de dispariție, respectiv rasa Sură de stepă în vederea asigurării biodiversității resurselor genetice a populațiilor de animale*”, Coordonator S.C.D.C.B. Dancu, Partener USAMV Iași;
2. **Program sectorial ADER 2015-2018, Contract 5.3.2./03.11.2015 (2015-2018)**, “*Cercetări privind intensivizarea procesului de reproducție la taurine prin biotehnologii de reproductive*”, Coordonator S.C.D.C.B. Dancu;
3. **Program sectorial ADER 2015-2018, Contract ADER nr. 7.2.1./03.11.2015 (2015-2018)**, “*Îmbunătățirea potențialului productiv în fermele de vaci pentru lapte din N-E României prin producerea de embrioni in vitro folosind donatoare de ovocite înalt productive și material seminal (sexat și nesexat) provenit de la tauri testați*”, Coordonator S.C.D.C.B. Dancu.