

STUDIU PRIVIND VALORIFICAREA RESURSELOR GENETICE ANIMALE

1. Contextul științific

Creșterea populației umane la nivel global, precum și variațiile specifice din diferite țări și regiuni geografice au condus la o creștere a necesităților de asigurare a resurselor de hrană pentru alimentația umană, inclusiv a produselor lactate. Astfel, sectorul creșterii animalelor trebuie să facă față acestui trend prin asigurarea unor producții lactate îmbunătățite atât sub aspect cantitativ, cât și calitativ, fie prin utilizarea unor rase înalt specializate pentru producția de lapte sau fie a unor rase autohtone și implementarea unor programe de ameliorare la animale (Woelders et al 2006, Tricarico et al. 2020). În România, regiunile Nord-Est și Nord-Vest prezintă efectivele cele mai mari de bovine (STATISTICA, 2021), iar județul Sălaj este situat în regiunea Nord-Vest și prezintă o largă varietate geografică, ce constă în principal din zone de deal și montane, bovinele din această zonă având valori ale producției lactate apropiate de cele înregistrate la nivel național (ESTAT, 2021). De asemenea, județul Sălaj este cunoscut pentru efectivele valoroase de bubaline (Coroian et al., 2012).

Caracterizarea populațiilor și raselor la animalele de fermă reprezintă prima etapă în dezvoltarea și implementarea programelor de ameliorare la animale (Hoffmann et. al., 2010; Vanvanhossou et al., 2021). În același timp, fondul genetic al resurselor animale prin genotipurile și fenotipurile prezente la indivizi susțin caracterizarea populațiilor de animale specifice anumitor zone (FAO, 2011; FAO, 2015). Mai mult, rasele autohtone pot prezenta un potențial genetic valoros pentru anumite caractere de interes zootehnic, inclusiv cele de adaptare și rezistență la anumiți factori de mediu sau boli (Socol et al., 2019).

Pe de altă parte progresul în domeniul geneticii animale, în special în cel al geneticii moleculare a facilitat identificarea și utilizarea în practica zootehnică a unor genotipuri și fenotipuri favorabile pentru îmbunătățirea producției lactate sub aspect cantitativ, dar și calitativ, în special de ordin nutrițional și sanogen prin prisma conținutului proteic, dar și lipidic.

Prevenirea bolilor reprezintă o preocupare la nivel global, eforturile fiind îndreptate înspre scăderea mortalității și creșterii speranței de viață, dietele alimentare fiind un element vizat în astfel de strategii (Sung et al., 2021). Laptele și produsele lactate sunt recomantate pentru a fi incluse în diete alimentare în baza valorii nutriționale și sanogene (Oberitter et al., 2013). Recent, cercetările în domeniu indică asocieri ai anumitor compuși din lapte în funcție de profilul molecular al proteinelor codificate cu diferite boli, inclusiv diferite forme de cancer (Bermejo et al, 2019; Leischner et al., 2021), variantele genetice pentru proteinele din lapte influențând calitatea laptelui, dar și apariția și evoluția anumitor boli (Ali et al., 2019); rezultatele obținute până în prezent prezintă contradicții cu privire la impactul anumitor variante alelice codificatoare pentru proteinele din lapte asupra sănătății umane.

2. Identificarea populațiilor animale de interes pe specii și rase

Situația dificilă cu care se confruntă sectorul creșterii animalelor în țara noastră impune dezvoltarea și implementarea unor programe de creștere și ameliorare a efectivelor de rase autohtone, în special prin tehnici de creștere în rasă curată. Conform datelor Agenției Naționale pentru Zootehnie „Prof. dr. G.K. Constantinescu” din subordinea Ministerului Agriculturii și Dezvoltării Rurale, în anul 2020, la nivel național un număr de 296.655

capete bovine au fost incluse în activitățile de control oficial pentru producția de lapte (ANZ, 2020), politicile și strategiile în sectorul zootehnic la nivel național vizând în mod special implementarea unor programe de ameliorare în special la taurine și bubaline, inclusiv prin aplicarea unor scheme de ajutor financiar. În ceea ce privește bovinele aflate în control oficial pentru producția de lapte, în județul Sălaj există efective considerabile din rasa Bălțată Românească de tip Simmental (BR-SIM), urmate de cele de Bălțată cu Negru Românească de tip Holstein-Friză (BNR-HF), alături de efective reduse din rasa Brună (B) și Montbeliard (MO), dar și un efectiv important de bivoli, conform datelor raportate la nivel național de către asociațiile de crescători de bovine care operează în acest județ (Tabelul 1).

Tabelul 1

Dinamica efectivelor de bovine aflate în control oficial pentru producția de lapte în județul Sălaj în perioada 2019-2021

An	Nr. total de taurine (capete)			Nr. total de bivoli (capete)	Nr. total de bovine (capete)
	Nr. total taurine	Rasa	Nr. total taurine /rasă		
2019	7079	BNR-HF	999	1.421	8.500
		BR-SIM	6037		
		MO	20		
		B	23		
2020	6483	BNR-HF	1030	1477	7960
		BR-SIM	5401		
		MO	20		
		B	32		
2021	6442	BNR-HF	1005	1528	7970
		BR-SIM	5411		
		MO	7		
		B	19		

În urma analizării datelor privind efectivele de bovine exploatate pentru producția de lapte la nivelul județului Sălaj, s-a observat că acestea prezintă un trend similar în ultimii ani, cu o ușoară creștere a numărului de capete de bivoli (1528 capete) în anul 2021, existând la nivel județean un număr de 7970 capete de bovine în 797 exploatații, din care 312 de vaci de lapte și 485 de bivoli, conform raportărilor din luna ianuarie a anului 2021.

Pentru cercetările privind valorificarea resurselor genetice animale (promovare, valorificare) specifice teritoriului (raselor de animale locale) din speciile de bovine (Bălțată românească, Brună de Maramureș, și Pinzgau), speciile de ovine (Țurcană, Tigaie și Merinos de Cluj) și capre (Carpatină) cu scopul selectării

speciilor/raselor/exemplarelor animale în vederea obținerii unor brânzeturi ecologice, DOP, Slow Food, Fast Good, Healty în lanțuri alimentare scurte de calitate (L.A.S.C.) cu valoare adăugată s-a procedat la: identificarea populațiilor animale și indivizilor de interes pe specii și rase din efectivele raportate și existente în zonă și la evaluarea potențialului genetic al acestora.

Astfel pentru caracterizarea indivizilor selectați din populațiile de animale de interes în vederea identificării indivizilor valoroși s-a stabilit urmărirea aspectelor de exterior și a datelor rezultate prin control oficial al performanțelor de producție. Astfel a fost realizată analiza datelor privind situația efectivelor de animale la nivelul județului Sălaj și în special din zona Sâg. În baza analizei situației efectivelor de animale din zonă au fost identificate speciile și rasele de interes luate în studiu, fiind stabilit numărul de indivizi/specie/rasă de la care au fost prelevate probe biologice de sânge în vederea caracterizării lor și a efectuării analizelor moleculare pentru identificarea profilului genetic existente și a celor favorabile producției de brânzeturi.

Ținând cont de rasele existente, mărimea efectivelor din această zonă, dar și de importanța pe care o prezintă rasele identificate pentru speciile vizate, pentru fiecare specie a fost luată în studiu o rasă, respectiv la taurine rasa Bălțată Românească (BR-SIM), la bubaline Bivolul Românesc (B), la ovine rasa Țurcană și la caprine rasa Carpatină.

3. Analiza în baze de date biologice și studierea profilului molecular polimorfic și chimic aferent genelor și proteinelor din lapte de interes pe specii și rase

✓ Compoziția laptelui de vacă, capra, oaie și bivoliță

Laptele provenit de la rumegătoare are o compoziție complexă prin faptul că acesta conține peste 100 de componente în suspensie sau sub formă de emulsie, într-o formă ușor asimilabilă de către organismul uman și animal. Principalele componente din lapte sunt: proteinele, grăsimea, enzimele, anticorpii, mineralele și vitaminele.

Procentul mediu de proteine din laptele variază în funcție de specie. În laptele de vacă acesta este în medie de 3,3%, în laptele de bivoliță de 4,1%, în laptele de oaie de 5,3%, iar în cel de capră de 3,7% (Iurcă și colab., 1998). La taurine, bubaline și ovine fracțiunea cazeinică reprezintă 80% din proteina totală, iar la capra 70%, diferența fiind reprezentată de proteinele din lactoserum.

Fracțiunea cazeinică este alcătuită din alfa S1-cazeina, alfa S2-cazeina, beta-cazeina și K-cazeina. În laptele proaspăt acestea sunt organizate sub forma de miceli care înglobează în ele moleculele fosfat de calciu. Această fracțiune precipită sub forma unui coagulum, prin adaos de cheag sau acidifiere la pH=4,6, în procesul de obținere al branzeturilor și înglobează în ea particule de grăsime și alte componente din lapte. Proporția fracțiunii cazeinice influențează randamentul de obținere al branzeturilor.

Proteinele din zer sunt reprezentate de beta-lactoglobulină și alfa-lactoalbumină și alte proteine minore. Această fracțiune nu precipită decât prin fierbere, când formează urda.

✓ Polimorfisme genetice asociate cu compoziția laptelui și calitatea de procesare a acestuia pentru obținerea branzeturilor

Proteinele din lapte pot fi clasificate în două grupe majore, respectiv cazeine și proteine din zer, în timp ce cantitatea de proteine din lapte prezintă diferențe în funcție de specie și rasă. În general, laptele de vacă prezintă valori procentuale de proteină de cca 3,2%, din care 80% sunt reprezentate de cazeine și 20% de proteine din zer, ce cuprind α -lactalbuminele și β -lactoglobulinele. Laptele de bovine conține patru tipuri de cazeină alpha s1 (CSN1S1), alpha s2 CSN1S2, beta (CSN2), kappa (CSN3) și gamma, cea din urmă reprezentând produsul de degradare al beta-cazeinei. Dintre cazeine, cazeina beta se regăsește în cantitatea cea mai mare în lapte. În funcție de rasă, cazeinele

din lapte prezintă diferite variante genetice ce sunt responsabile de producerea diferitelor fragmente proteice biologic active în urma proceselor de digestie gastrointestinală sau a proceselor de procesare alimentară, respectiv procese de hidroliză și fermentație (Park and Nam, 2015). Frațiunile cazeinice și proteice din zer precum cazeinele α -, β -, κ -, lactapin (un fragment al κ -cazeinei), PGPIP (un fragment al β -cazeinei), INKKI (un fragment al β -cazeinei), casomorfinele, cazein fosfopeptidele, dar și alți compuși prezintă activitate antitumorală (Leischner et al., 2021). Beta-casomorfinele (BCMs) sunt peptide bioactive ce se formează din β -cazeină, cele mai întâlnite forme fiind BCM-7 (din varianta alelică A1 a beta cazeinei) și BCM-5 (din varianta alelică A2 a beta cazeinei); variantele alelice ale beta cazeinei sunt întâlnite în diferite forme de genotipuri la anumite rase (Priyadarshini et al., 2018; Park and Haenlein, 2021).

Pe de altă parte, la taurine genotipurile CC al α S1-CN, BB al K-CN și BB al β -LG au fost asociate cu un conținut mai mare de cazeină și proteină totală în lapte, iar genotipul BB al β -LG cu un conținut mai mare de grăsime în lapte, ceea ce determină un timp de coagulare mai scurt. Mai mult, genotipul BB al K-CN are un efect pozitiv asupra randamentului de obținere al brânzeturilor. La caprine alela A a α S1-CN prezintă un efect pozitiv asupra conținutului de proteină și grăsime din lapte, dar și al proprietăților de prelucrare a laptelui. De asemenea, brânzeturile provenite din lapte obținut de la animale cu genotip AA prezintă un gust mai slab pronunțat de capră, în baza unor procese de lipoliză mai puțin accentuate.

Prin analiza a în baze de date moleculare au fost identificate secvențele ADN codificatoare pentru cazeinele din lapte. Cazeinele sunt localizate la nivelul clusterului BTA6 într-o anumită ordine (BTA position 6:87181619) și prezintă diferite SNP-uri (Boettcher et al., 2004; Meier et al., 2019), apărute în urma unor procese de mutație în anumite situsuri (Figura 1).

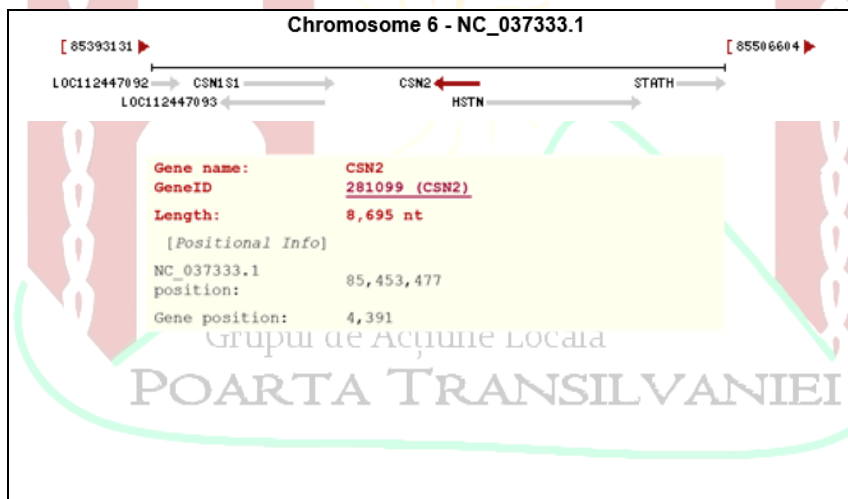


Figura. 1 Localizarea cazeinelor și a CSN2 la *Bos taurus* (date selectate și extrase din NCBI Gene) (Sursa: date extrase și adaptate din baza de date NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Au fost realizate activități de informare, documentare și analiză în baze de date biologice a profilelor polimorfice și chimice aferente genelor și proteinelor din lapte la speciile de interes. Au fost stabilite genele codificatoare pentru proteinele din lapte ce urmează a fi urmărite și caracterizate sub aspect molecular în vederea identificării variatelor alelice și genotipurilor asociate cu profile favorabile pentru producerea brânzeturilor și cu efecte sanogene.

La rumegătoare cele șase proteine majore din lapte sunt codificate de gene nealele. Proteinele din fracțiunea cazeinica sunt codificate de patru gene situate pe cromozomii din perechea 6 în următoarea ordine: α s1-CN, β -CN,

α s2-CN, K-CN (Threadgill și colab., 1990; Hayes și colab., 1993a). Gena care codifică α -LA a fost localizată pe cromozomii din perechea 5 (Soulie și colab., 1989; Vilotte și colab., 1987), iar cea care codifică β -LG a fost localizată pe cromozomii din perechea 11 (Hayes și colab., 1993b).

Laptele de vacă este la nivel global principala materie primă din industria produselor lactate. Calitățile nutriționale ale brânzeturilor și efectele benefice asupra sănătății sunt evidente.

Cu toate acestea unele componente ale laptelui (ex. proteinele sau lactoza) pot avea efecte negative asupra sănătății anumitor persoane la care pot produce alergii, care sunt cauzate în principal de alfa s1 cazeină și beta-lactoglobulină (Molkhou și colab., 2006). Mai mult decât atât, o serie de studii au evidențiat faptul că proteina sintetizată de alela A1 a beta-cazeinei de la taurine ar fi implicată în etiologia unor boli cum ar fi: diabetul de tip 1, cardiopatia ischemică sau probleme de digestie (Kaminski și colab., 2007). Tipul A2 de proteina produs de alela A2 are conform studiilor un efect benefic asupra sănătății. La taurinele mai puțin ameliorate această alela A2 are o frecvență mare, fiind considerată alela ancestrală. Studiile au evidențiat faptul că prin digestia laptelui de tip A1A1 se eliberează cantități semnificative dintr-o peptidă cu acțiune mimetică morfinei, denumită β -cazomorfina 7 - BCM7 (Jinsmaa și colab., 1999, Kost și colab., 2009). Frecvența genotipurilor β -cazeinei a fost evidențiată și la rasele taurine autohtone (Bâlțeanu și colab., 2010).

Pe de altă parte o serie de studii au arătat faptul că unele alele de la locii care codifică proteinele din lapte sunt asociate cu compoziția laptelui și cu randamentul de obținere al brânzeturilor.

La taurine studiile au evidențiat faptul că genotipul BB este asociat cu un conținut mai mare al laptelui în proteină totală și cazeină în comparație cu genotipul AA (Jakob și colab., 1994; Fitzgerald și colab., 1997). Timpul de formare al coagului a fost mai mic în cazul genotipurilor BB, comparativ cu cele AA (Oloffs și colab., 1991; Jakob și colab., 1994; Kubarsepp și colab., 2005). De asemenea, fermitatea coagului a fost cu 50% mai mare în cazul brânzeturilor produse din lapte de tip BB, comparativ cu cele produse din lapte de tip AA (Jakob și colab., 1994; Fitzgerald și colab., 1997). În mai multe studii s-a constatat faptul că diferențele privind randamentul de transformare al laptelui în brânzeturi poate varia între 2,7-6,2%, în funcție de tipul de brânză fabricată (Van den Berg și colab., 1992; Fitzgerald și colab., 1997; Walsh și colab., 1998).

La caprine studiile au evidențiat faptul că polimorfismul genei alfa s1 cazeinei influențează semnificativ compoziția laptelui și randamentul de obținere al brânzeturilor. La rasele franceze de caprine s-au constatat diferențe de peste 15% între genotipurile de tip AA și FF în ceea ce privește cantitatea de brânză obținută din aceeași cantitate de lapte (Delacroix și colab., 1996). Rezultate similare au fost obținute și la rasele Spaniole (Diaz și colab., 1994) și la rasele Italiene (Meggiolaro și colab., 2000).

La ovinele din rasa Sarda au fost evaluate trei genotipuri de la locusul alfa s1 cazeinei (CC, CD și DD). Analizele au evidențiat faptul că genotipul CC de la acest locus are un efect pozitiv marcant asupra conținutului de cazeină, comparativ cu genotipurile CD (+3,5%), respectiv DD (+8,6%) (Pirisi și colab., 1999). De asemenea, randamentul de transformare al laptelui în brânzeturi a fost superior față de genotipurile CD, respectiv DD (Pirisi și colab., 1999).

Prin urmare, implementarea testării ADN pentru acești markeri, ca și criteriile de selecție a reproducătorilor, poate aduce beneficii importante crescătorilor și procesatorilor, deoarece poate duce la obținerea într-un timp mai scurt a unor animale producătoare de lapte cu calități superioare de procesare și implicit la rentabilizarea procesului de obținere al brânzeturilor.

4. Scopul analizelor la nivel molecular

Analizele genetice au fost efectuate cu scopul de a evalua frecvențele unor alele de la anumiți loci care au fost asociate în studiile publicate din literatura de specialitate cu compoziția laptelui și randamentul de transformare în branzeturi. De asemenea, unele studii au evidențiat posibilă implicare a unor proteine din lapte în apariția și dezvoltarea unor boli la om. S-a stabilit ca testele genetice să fie axate pe speciile următoare: taurine, bubaline, ovine și caprine, la care conform literaturii de specialitate polimorfismul genelor care codifică proteinele majore din lapte au efect semnificativ asupra parametrilor laptelui menționați anterior.

In cazul taurinelor au fost analizați doi markeri genetici de la doi loci diferiți:

1. K-caseina - asociată în literatură cu calitatea laptelui și randamentul de obținere al branzeturilor;

2. Beta caseina - asociată în anumite studii din literatură cu diabetul de tip 1, cardiopatia ischemică sau probleme de digestie.

In cazul caprinelor a fost testat polimorfismul genei alfa s1 caseinei, care a fost asociată semnificativ cu conținutul de caseină coagulabilă din lapte, proprietățile de coagulare și cu randamente diferite de transformare în branzeturi a laptelui de capra provenit de la diferite genotipuri.

La ovine și bubaline polimorfismul proteinelor este redus și prin urmare nu există în literatură date concludente privitoare la influența acestuia asupra compoziției și calității de procesare a laptelui.

5. Materialul biologic, recoltarea și depozitarea probelor de sânge

Probele biologice de sânge au fost recoltate cu respectarea normelor de igienă, siguranță și sănătate animală, în condiții sterile, cu ajutorul unor vacutainere cu anticoagulant K_3EDTA și ace de recoltare, fiind întocmite și fișe de recoltare pentru probele de sânge prelevate. Tuburile de recoltare (vacutainerele) utilizate pentru prelevarea probelor de sânge sunt fabricate din plastic și vidate, ceea ce permite recoltarea unei cantități exacte de sânge. Aceste tuburi conțin substanța K_3 de EDTA (acid etilendiaminotetraacetic), care are ca scop prevenirea coagulării sângelui. De asemenea au fost utilizate ace de recoltare pentru sânge în vacutainere, verzi și holdere (Figura 2, Figura 3, Figura 4), cu recoltare în vid și streilitatea probelor, deoarece au fost prevăzute cu manșon de cauciuc, capac protector, atraumatic, asigurând calitatea probei (fiind exclus riscul contaminării probei sau al personalului).

Pentru recoltare, fiecare animal a fost conționat, iar eprubetele cu fost marcate corespunzător, conform datelor înscrise pe fișele de recoltare, fiind atribuite numere de ordine și stocate separat ținând cont de specie. De la fiecare individ a fost prelevată o cantitate de 3 ml de sânge (Figura 5). Probele de sânge recoltate au fost transferate într-o ladă frigorifică și transportate în laborator (Figura 6, Figura 7, Figura 9), unde au fost apoi transferate în tuburi Eppendorf de 1,5 ml sterile, marcate corespunzător pentru a asigura condițiile de identificare a acestora; ulterior acestea au fost depozitate la o temperatură de $-20^{\circ}C$, până în momentul efectuării analizelor moleculare de laborator.



Figura 2. Tub de recoltare (vacutainer) utilizat pentru prelevarea probelor de sânge
(Sursa: original)

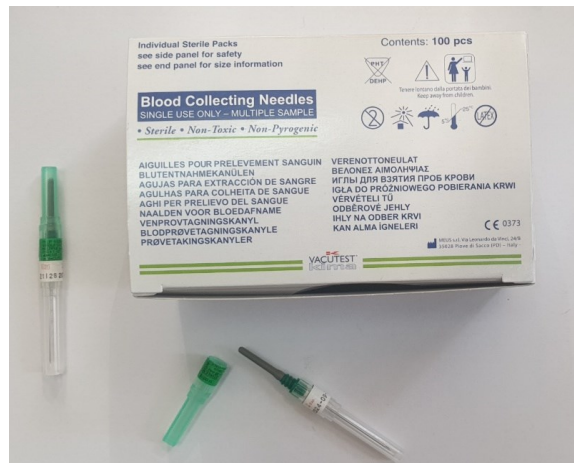


Figura 3. Ace de recoltare pentru sânge în vacutainere, verzi, 21 G x 1 1/2 ” (0.8 mm x 38 mm)
(Sursa: original)



Figura 4. Holder pentru ac vacutainer
(Sursa: original)



Figura 5. Ansamblu complet format din vacutainer, ac și holder utilizat la recoltarea probelor de sânge
(Sursa: original)



Figura 6. Recoltarea probelor biologice la bubaline
(Sursa: original)



Figura 7. Recoltarea probelor biologice de sânge la ovine și caprine
(Sursa: original)

Formular recoltare probe

Specia	Rasa	Nr. matricol animal	ID probă pe tubul de recoltare	Numar cod de exploatare	Localitate / Judet
BOVINE	BR	505003681945	1	1426670128	TUSA.31 SALAS
BOVINE	BR	507009807859	2	1426670128	TUSA.31 SALAS
BOVINE	BR	502001115095	3	1426670128	TUSA.31 SALAS
BOVINE	BR	508001115095	4	1426670128	TUSA.31 SALAS
BOVINE	BR	507008859555	5	1426670128	31TUSA SALAS
BOVINE	BR	507006970365	6	1426670258	294TUSA SALAS
BOVINE	BR	507002230854	7	1426670158	294TUSA SALAS
BOVINE	BR	502003528766	8	1426610090	251TUSA SALAS
BOVINE	BR	507001753969	9	1426670256	38TUSA SALAS
BOVINE	BR	507001754493	10	1426670256	38TUSA SALAS

Figura 8. Formular recoltare pentru probele de sânge utilizat la deplasările în teren
(Sursa: original)



Figura 9. Depozitarea probelor de sânge post-recoltare pe blocuri de gheață în cutie termoizolantă cu capac pentru transport
(Sursa: original)

Formularele de recoltare înscrise în teren (Figura 8) au fost ulterior centralizate și operate în sistem electronic.

Probele biologice au fost recoltate de la animale din arealul în care se implementează proiectul (Figura 10, Figura 11). Au fost recoltate probe de la patru specii de rumegătoare conform tabelului următor (Tabelul 2).



Numărul de indivizi și speciile de la care s-au prelevat probe de sânge în Tusa, com Sâg, SJ

14 capete bovine
30 capete ovine
30 capete caprine

Figura 10. Indivizii de la speciile ovine și caprine de la care s-au recoltat probe de sânge în comuna Tusa, județul Sălaj
(Sursa: fotografiile originale; <https://www.google.com/maps>)

Numărul de indivizi de la care s-au prelevat probe de sânge în Valea Lungă, comuna Zalha, SJ
3 capete bubaline

Numărul de indivizi de la care s-au prelevat probe de sânge în Valea Vârteșca, comuna Zalha, SJ
2 capete bubaline

Numărul de indivizi de la care s-au prelevat probe de sânge în Meseșeni de Sus, comuna Meseșeni de Jos, SJ
6 capete bubaline

Numărul de indivizi de la care s-au prelevat probe de sânge în Măriș, comuna Crasna, SJ
1 capete bubaline

Numărul de indivizi de la care s-au prelevat probe de sânge în comuna Românași, SJ
7 capete bubaline

Numărul de indivizi de la care s-au prelevat probe de sânge în comuna Dragu, SJ
10 capete bubaline

Numărul de indivizi de la care s-au prelevat probe de sânge în comuna Buciumi, SJ
4 capete bubaline

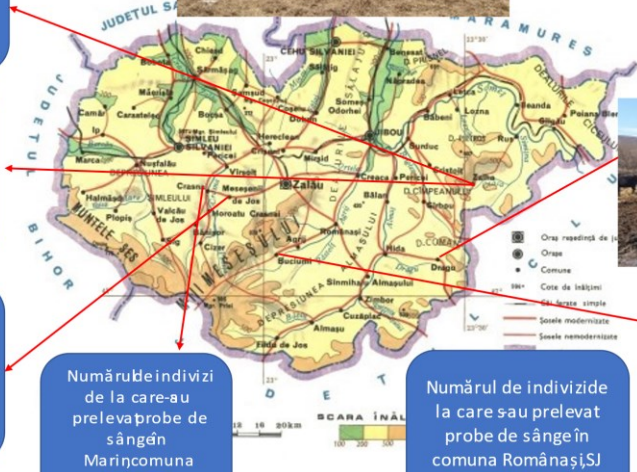


Figura 11. Indivizii de bubaline de la care s-au recoltat probe de sânge și repartizarea acestora pe ferme
(Sursa: fotografiile originale; <https://www.google.com/maps>)

Tabelul 2

Probe biologice de sânge recoltate

Specia	Rasa	Nr. probe	Nr. exploatații zootehnice
Taurine	Băltata Romanească	14	4
Caprine	Carpatina	30	1
Ovine	Țurcana	30	1
Bubaline	Bivol Românesc	34	12

6. Metodologia de lucru pentru analizele moleculare la nivel ADN

6.1 Extracția și purificarea ADN

Materialul genetic ADN a fost izolat din probe biologice recoltate, iar purificarea acestuia a fost realizată cu ajutorul kit-ului de purificare comercial ReliaPrep (Promega) (Figura 12). Extracția ADN a fost realizată în baza acesluiasi protocol pentru toții indivizii luați în studiu. Din probe biologice recoltate o cantitate de 200 μ l de sânge a fost transferată în tuburi Eppendorf marcate corespunzător probelor de sânge utilizate pentru extracție. Peste cei 200 μ l de sânge a fost adăugată o soluție de 20 μ l Proteinaza K și 200 μ l de soluție de liză. Amestecul a fost apoi incubat timp de 10 minute la o temperatură de 56°C. Peste lizatul rezultat a fost adăugată o cantitate de 250 μ l soluție tampon de legare (binding buffer). Amestecul a fost vortexat pentru omogenizare și ulterior a fost adăugat în colonițele de purificare. Ansamblul a fost apoi centrifugat la 12000 rpm timp de 1 minut. În etapa de spălare a protocolului, au fost realizate două spălări cu o cantitate de 500 μ l soluție tampon de spălare (wash buffer). Eluția ADN a fost realizată cu 200 μ l apă pură sterilă.

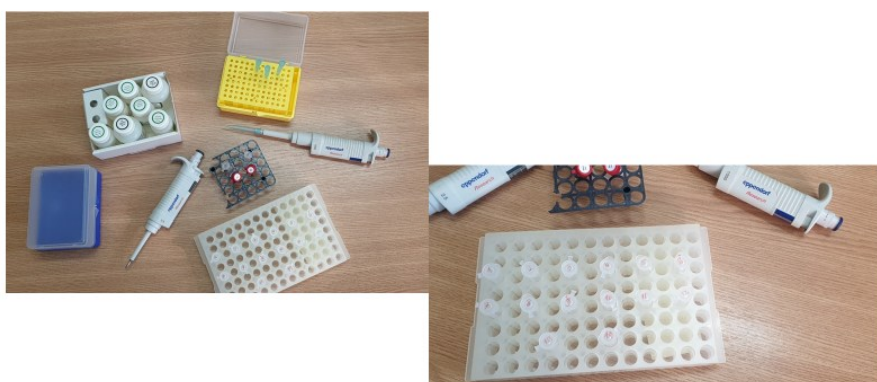


Figura 12. ADN izolat din probe biologice de sânge.

Tuburi Eppendorf cu ADN-ul izolat din sânge; Materiale utilizate pentru extracția ADN în laboratorul de Genetică Moleculară al USAMV Cluj-Napoca: micropipete, tuburi Eppendorf, suporturi pentru tuburi Eppendorf, cutie cu vârfuri pentru micropipete, kit de izolare și purificare

(Sursa: original)

Probele ADN izolate și purificate de la toți indivizii luați în studiu au fost apoi utilizate ca material pentru analizele de genotipare a markerilor moleculari de interes stabiliți anterior, în vederea obținerii unei producții de lapte cu calități superioare de procesare pentru producerea de brânzeturi sau pentru evaluarea incidenței variantelor alelice ale genelor de interes, inclusiv a beta-azeinei la taurine, pentru care anumite varinate alelice mutante au fost asociate cu anumite patologii umane.

6.2 Analizele moleculare de genotipizare

✓ Amplificarea PCR, analiza PCR-RFLP și/sau secvențierea ADN

Dependent de tipul de marker țintit și de specia, respectiv rasa analizată, pentru analizele de genotipizare au fost implementate metode de laborator diferite: PCR, PCR-RFLP și/sau secvențiere. Pentru reacțiile de amplificare ADN au fost utilizați primeri specifici genelor de interes, respectiv regiunilor ADN polimorfice țintite, pentru evidențierea mutațiilor care diferențiază alelele de la locii studiați (Figura 13).

Spectofotometru UV/VIS (NanoDropND100)
utilizat pentru determinarea concentrației și
purității acizilor nucleici



Real Time PCR utilizat pentru amplificarea
produșilor PCR



Figura 13. Aparatura de laborator utilizată pentru efectuarea analizelor moleculare de amplificare ADN
(Sursa: original)

➤ **La caprine**, pentru identificarea principalelor variante alelice (A, B/E și F) ale genei alfa s1 cazeinei, ce influențează compoziția laptelui și randamentul de obținere a brânzeturilor, au fost utilizați pentru amplificare primeri specifici (sens și antisens). Amplificarea a vizat întreaga secvență a exonului 9 și parțial intronii 8 și 9, ai genei alfa s1 cazeinei, unde sunt localizați locii polimorfici ai acestei alele. Alela A se diferențiază față de alelele B/E și F printr-o deleție de 11 nucleotide la nivelul intronului 9, iar alela F se diferențiază de alelele B/E, respectiv A prin deleția unei citozinei în exonul 9.

Procedura de amplificare a regiunii genomice polimorfice din gena alfa s1 cazeinei a fost realizată cu ajutorul unui amestec de amplificare (Promega), compoziția acestuia fiind redată în Tabelul 3.

Tabelul 3

Compoziția amestecului utilizat pentru reacția de amplificare PCR

Componenți ai amestecului	Volum pentru 1 probă (μl)
Apa pura sterilă	8.5
Master mix 2X	12.5
Primer forward	1
Primer revers	1
Volum total de reacție	23

Din amestecul de amplificare, 23 μl au fost transferați în tuburi PCR de 0.2 ml, peste 2 μl de ADN izolat și purificat. Reacțiile PCR au fost realizate în termocycler conform următorului program de amplificare:

- 1) predenaturarea la 95°C/3 minute (1 ciclu)
- 2) amplificarea cu mai multe faze:
 - a) denaturarea la 94°C/1 minut
 - b) fixarea primerilor la 60°C/1 minut
 - c) extensia la 72°C/1 minut (35 cicluri).

Pentru identificarea alelelor A, B/E, respectiv F ale genei alfa s1 cazeinei la caprine și a genotipurilor s-a procedat la efectuarea unei analize de restricție. Producții de amplificare rezultate au fost supuse unei reacții de digestie enzimatică cu enzima de restricție PdmI (Thermo Scientific). Probele au fost incubate la 37°C timp de 2 ore. Producții de digestie, respectiv fragmentele ADN rezultate în urma reacției enzimatice au fost analizate electroforetic. Astfel, au fost migrați în gel de agaroză 2,5%, colorarea fiind realizată cu soluție 1X Sybr Safe, un colorant fluorescent ce permite vizualizarea ADN. Electroforeza a fost realizată în soluție tampon TBE 1X (pH= 8.5), timp de 1 oră, la un voltaj constant de 75V. Gelul a fost analizat cu sistemul Gel Doc EZ System (BioRad). Pe baza profilurilor de digestie au fost identificate alelele (A, B/E și F) și genotipurile aferente.

✓ **Secvențierea unor ampliconi obținuți din amplificarea regiunii polimorfe din gena alfa s1 cazeinei**

Pentru identificare mutațiilor, ce caracterizează alelele A, B/E și F de la locusul alfa s1 cazeinei observate prin digestie cu enzima PdmI, o parte din producții obținute în câteva reacții de amplificare au fost secvențiate. Pentru realizarea reacției de amplificare pentru secvențiere, un volum de 4 μl de produs PCR / probă a fost purificat cu câte 2 μl de enzimă ExoSap (Thermo Scientific) prin incubare la 37°C, 1 minut. Analiza de secvențiere a fost realizată cu ajutorul kitului de secvențiere BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Producții rezultate din amplificarea de secvențiere au fost purificate și secvențiate într-un secvențiator SeqStudio (Thermo Scientific). Cromatogramele rezultate prin analizele de secvențiere au fost analizate cu ajutorul programului Chromas. Genotipurile de la locusul alfa s1 cazeinei au fost stabilite pe baza mutațiilor specifice, care caracterizează alelele A, B/E și F localizate în regiunea secvențiată.

➤ **La taurine** a fost amplificată câte o regiune polimorfică pentru fiecare dintre cei doi markeri luați în studiu.

În cazul *beta - cazeinei*, pentru diferențierea principalelor alele A2 (alela ancestrală), respectiv A1 (aparută ca mutație la rase de vaci specializate), a fost amplificată regiunea codificatoare a exonului 7. La nivelul codonului 67 se găsește localizată o substituție nucleotidică, ce produce substituația unei proline (Pro) în proteina A2 cu o histidină (His) în proteina A1.

Amplificarea PCR a exonului 7 de la indivizii analizați a fost realizată cu ajutorul unui amestec de amplificare (Promega), conform protocolului anterior utilizat (Tabelul 3) și folosind doi primeri specifici (sens și antisens), specifici regiunii exonului 7 ai genei *beta - cazeinei* de la taurine. Pentru identificarea genotipurilor prezente, produșii de amplificare au fost analizați prin secvențiere, cu primerii folosiți la amplificarea PCR. Analiza de secvențiere a fost similară cu cea folosită pentru alfa s1 cazeina la caprine. Identificarea mutațiilor specifice alelelor *beta-cazeinei* de la taurine și stabilirea genotipurilor a fost realizată prin analiza cromatogramelor de secvențiere.

➤ În cazul *k-cazeinei* a fost amplificată o regiune polimorfică reprezentată de o parte din exonul IV și intronul IV, regiune în care se afla două regiuni polimorfe (în codonul 136, respectiv 148,) care diferențiază alela A de alela B (asociată cu un randament superior de procesare a laptelui de vacă pentru obținerea brânzeturilor). Pentru aceasta a fost utilizat același amestec de reacție (Tabelul 3) și procedură de amplificare PCR, menționate anterior. Pentru amplificarea regiunii polimorfe de interes menționate au fost folosiți doi primeri specifici acestei regiuni din gena *K-cazeinei* de la taurine.

Pentru diferențierea alelelor A și B ale *K-cazeinei* de la taurine produșii de amplificare obținuți au fost digerați cu enzima de restricție *Hinf 1* (Promega) prin incubare la 37°C timp de 2 ore. Produșii de digestie au fost migrați în gel de agaroză 2,5%. Colorarea ADN a fost realizată cu 1X Sybr Safe colorant fluorescent. Electroforeza a fost realizată în tampon TBE 1X (pH= 8.5) timp de 1 oră la un voltaj constant de 75V. Gelul a fost analizat cu sistemul Gel Doc EZ System (BioRad). Pe baza profiurilor de digestie au fost identificate alelele (A și B) și identificate genotipurile la locusul *K-cazeinei* de la taurine.

➤ **La bubaline și ovine**, în mod similar au fost analizate prin tehnica secvențierii regiunile polimorfe din gena alfa s1 cazeinei.

7. Rezultate și discuții pentru analizele moleculare efectuate

7.1 Rezultate și discuții privind genotiparea carprinilor la locusul alfa s1 cazeinei

Analiza datelor rezultate din amplificarea și secvențierea exonului 9 din gena *alfa s1 cazeinei* și parțial a intronilor 8 și 9 a permis identificarea cu precizie mutațiilor care caracterizează alelele A, B/ E și F și a genotipurilor formate din combinarea acestora (Figura 14).

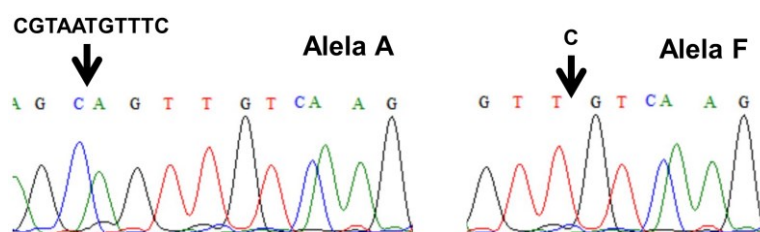


Figura 14. Cromatogramă de secvențiere evidențind mutații caracteristice alelelor alfa s1 cazeinei de la caprine

În cazul alelelor B/E mărimea ampliconului obținut a fost de 224 pb, deoarece acestea sunt identice în această regiune. În cazul alelei F, ampliconul a avut o mărime de 223 pb datorită deleției citozinei din poziția 23 a exonului 9. În cazul alelei A, mărimea ampliconului este mult diminuată din cauza deleției de 11 nucleotide din intronul 9.

Analiza fragmentelor digerate cu enzima PmlI prin migrare în gelul de electroforeză au evidențiat profile de restricție în concordanță cu rezultatele de secvențiere. În cazul alelei A, produsul de amplificare de 213 pb este digerat în două fragmente de 150 pb, respectiv unul de 63 pb. Ampliconul de 224 pb este digerat în două fragmente de 161 pb, respectiv 63 pb. În cazul alelei F deleția citozinei duce la inactivarea situsului de restricție pentru enzima PmlI și de aceea ampliconul de 223 pb rămâne nedigerat (Figura 15).

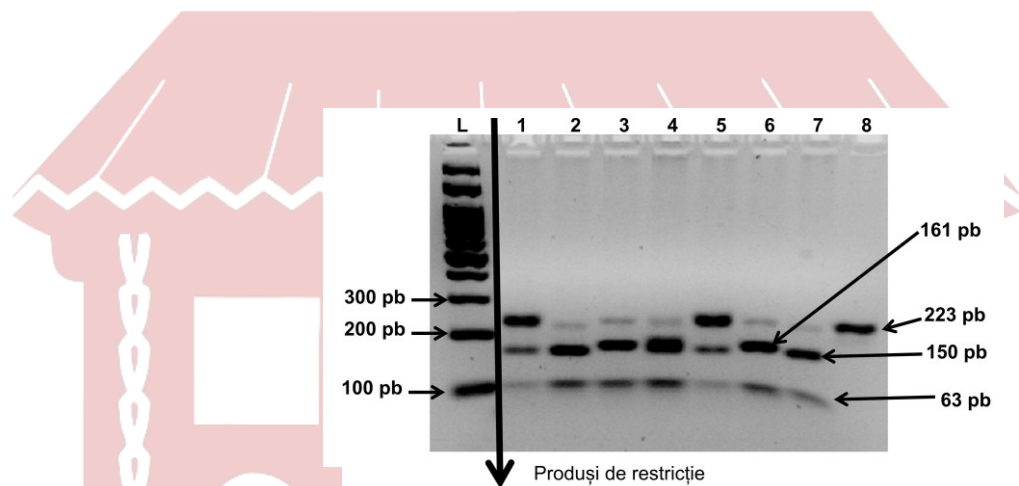


Figura 15. Determinarea prin PCR-RFLP a genotipurilor caprinelor analizate la locusul alfa s1 caseinei

Pe baza datelor de genotipare au fost estimate frecvențele alelelor și genotipurilor în populația analizată. La caprinele din rasa Carpatină frecvențele cumulate ale alelelor cu expresie puternică de tip A sau B a fost de 0,68 (68 %), iar cea a alelelor defective de tip E și F de 0,32 (32%). Frecvențele relativ mari ale alelelor cu expresie puternică (A și B) are o semnificație pozitivă deoarece acestea alele (A și B) au efect pozitiv asupra compoziției laptelui și a randamentului de obținere al brânzeturilor. Ambele categorii de alele au fost identificate în diverse combinații de genotipuri. De menționat este faptul că frecvențele genotipurilor defective de tip FF a fost de 0,17 (17%), ceea ce reprezintă un aspect negativ, deoarece aceste animale produc un lapte cu un conținut scăzut de proteină coagulabilă. Aceste rezultate privind frecvențele alelelor și genotipurilor de la locusul alfa s1 caseinei sunt în concordanță cu cele obținute în alte studii efectuate la rasa de caprine Carpatină.

Conform datelor din literatura de specialitate, la rasa Carpatină experimentele care au vizat evaluarea compoziției laptelui și a randamentului de transformare în brânzeturi pe două categorii de genotipuri (AA și FF) de la locusul alfa s1 caseinei au evidențiat diferențe semnificative între parametrii analizați. Astfel a fost constată o superioritate a genotipurilor AA comparativ cu a genotipurilor FF în ceea ce privește conținutul de grăsime (1,2g/100g) și proteină (0,6g/100g). De asemenea, a fost constată o diferență medie de 20% privind cantitatea de brânză obținută de la genotipurile AA, comparativ cu cele FF (Bălțeanu, 2021).

Prin urmare, recomandarea ar fi ca populațiile de caprine care vor fi incluse în programul de colectare a laptelui în vederea procesării lui în branzeturi să utilizeze la reproducție animale genotipate pentru acest marker și purtătoare ale alelelor și genotipurilor favorabile în acest sens. Așa cum a fost evidențiat în studii din literatura prezentate anterior, polimorfismul genei alfa s1 caseinei are un efect foarte important asupra compoziției laptelui și a randamentului de obținere a branzeturilor.

16

7.2 Rezultate și discuții privind genotiparea taurinelor la locii beta-caseinei și K-caseinei

În cazul *beta-caseinei* analiza datelor rezultate din amplificarea și secvențierea exonului 7 a permis identificarea mutației care caracterizează alela A2 (alela ancestrală), respectiv A1, prezentă în codonul 67 din exonul 7 (Figura 16).

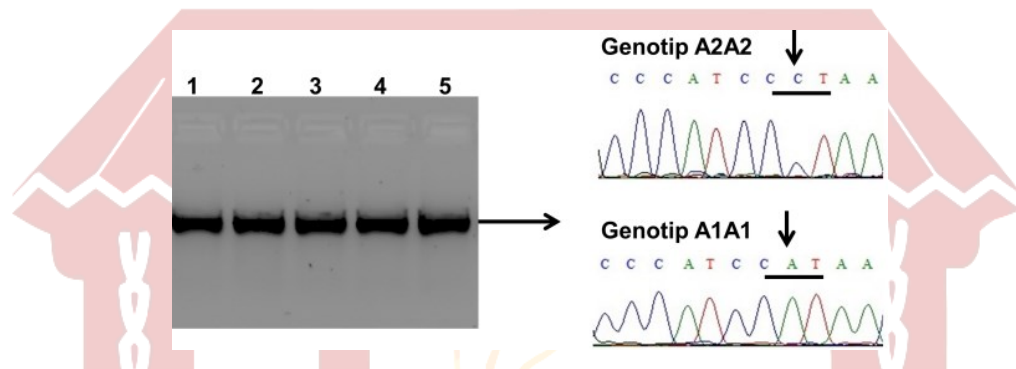


Figura 16. Cromatogramă de secvențiere evidențiind o mutație de tip C/A caracteristică alelelor A2 și A1 din gena beta-caseinei de la taurine

Alela A2 a beta-caseinei de la taurine (codificată de o alelă a beta-caseinei de pe cromozomul 6) este evidențiată în Figura 16 prin prezența codonului CCT în poziția 67, care în proteină codifică aminoacidul prolina (Pro). Aceasta a apărut prima dată în evoluția taurinelor și este întâlnită cu o frecvență foarte mare la rasele de taurine mai puțin ameliorate. Alela A1 se caracterizează prin prezența în poziția 67 a codonului CAT, care codifică aminoacidul histidina (His) și a apărut mai târziu în istoria evoluției taurinelor printr-o substituție de tip C/A. În Figura 16 sunt evidențiate diferențele constatate prin secvențiere între genotipurile homozigote de tip A2A2, respectiv A1A1. Frecvența genotipurilor homozigote A1A1 a fost mai mare comparativ cu cea a genotipurilor A2A2 la cele 14 taurine analizate prin genotipizare.

Având în vedere faptul că proteinele de tip A1 au fost asociate în unele studii cu unele boli cum ar fi: diabetul de tip 1, cardiopatia ischemică sau probleme de digestie (Kaminski și colab., 2007, Fan, 2020, de Oliveira, 2021), recomandarea ar fi ca populațiile de taurine care vor fi incluse în programul de colectare a laptelui în vederea procesării lui în branzeturi să utilizeze la reproducție animale genotipate pentru acest marker. Acest lucru ar duce la creșterea frecvenței alelelor de tip A2 și implicit a genotipurilor care ar putea produce un lapte mai sănătos.

În cazul *K-caseinei* analiza fragmentelor digerate cu enzima Hinfl prin migrare în gelul de electroforeză au evidențiat profilele corespunzătoare celor trei genotipuri posibile, rezultate prin asocierea celor două alele A și B (Figura 17).

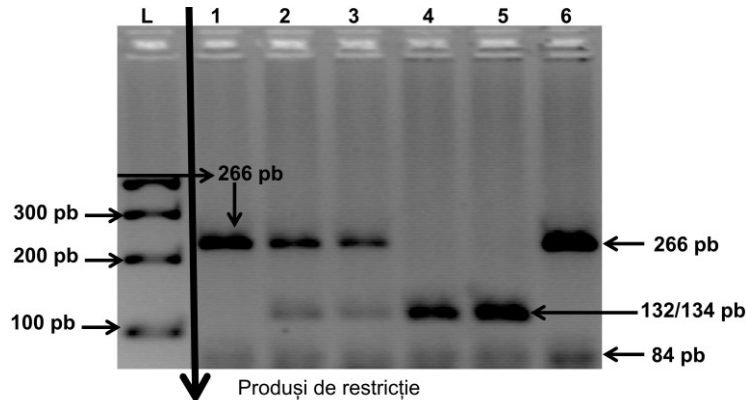


Figura 17. Determinarea prin PCR-RFLP a genotipurilor taurineilor analizate la locusul K-cazeinei

Diferențierea alelelor A și B ale K-cazeinei a fost realizată pe baza digestiei fragmentului de 350 pb amplificat, care conține o parte a exonului IV și intronului IV. Digestia ampliconilor cu enzima Hinf 1 a evidențiat profile de restricție diferite. Fragmentul de ADN (350 pb) care a fost amplificat din alela A conține situsuri de digeție pentru enzima Hinf I în pozițiile 134, respectiv 266. În urma digestiei cu enzima Hinf 1 rezultă trei fragmente: 132 pb, 134 pb și 84 pb corespunzătoare genotipului AA de la acest locus (Figura 17). Fragmentele de 132 pb și 134 pb comigrează în gelul de agaroză. În cazul alelei B a K-cazeinei de la taurine, unul din situsurile de restricție pentru enzima Hinf I este inactivat printr-o substituție. Prin digestie cu această enzimă rezultă două fragmente de 266 pb, respectiv de 84 pb, care corespund genotipurilor BB. La indivizii heterozigoți vor apărea toate cele patru fragmente digerate 266 pb, 132/134 pb respectiv 84 pb. Frecvențele genotipurilor homozigote, respectiv heterozigote evidențiate la cele 14 taurine genotipate au fost relativ egale.

Conform datelor din literatura de specialitate genotipul BB al K-cazeinei a fost asociat la diferite rase de taurine cu o compoziție mai bună a laptelui sub aspectul conținutului de grăsime și proteină și cu randamente superioare de procesare, care poate varia în funcție de tipul de brânză fabricată între 2,7-6,2% (Van den Berg și colab., 1992; Fitzgerald și colab., 1997; Walsh și colab., 1998, Fan, 2020). Prin urmare, recomandarea ar fi ca populațiile de taurine care vor fi incluse în programul de colectare a laptelui în vederea procesării lui în brânzeturi să utilizeze la reproducție animale genotipate pentru acest marker.

7.3. Rezultate și discuții privind genotiparea bubalinelor și ovinelor la locusul alfa s1 cazeinei

La bubaline și ovine au fost identificate variantele polimorfice ancestrale în regiunile alfa s1 cazeinei, ce au fost analizate prin secvențiere, și în concordanță cu alte studii realizate.

8. Concluzii privind analizele moleculare

Cercetările genetice realizate în această fază a proiectului au avut ca scop evaluarea frecvențelor unor alele la unii loci care codifică proteinele din lapte, la speciile luate în studiu (caprine - alfa s1 cazeina; taurine - beta cazeina și K-cazeina; bubaline - alfa s1 cazeina; ovine - alfa s1 cazeina). Unele polimorfisme de la acești loci, respectiv alela B la k-cazeină și A2 la beta-cazeină au fost asociate cu un conținut mai mare de proteină în lapte și cu randamente superioare de procesare la obținerea brânzeturilor sau cu un efect sanogen asupra sănătății umane.

La caprinele din rasa Carpatină frecvențele genotipurilor defecte de tip FF a fost de 0,17 (17%), ceea ce reprezintă un aspect negativ deoarece aceste animale produc un lapte cu un conținut scăzut de cazeină coagulabilă.

Cu toate acestea, genotipurile care conțin cel puțin o alelă cu expresie puternică de tip A sau B au avut frecvențe medii de peste 80%, aspect pozitiv deoarece acestea au fost asociate cu randamente superioare de obținere a brânzeturilor cu până la 20%.

La taurine, genotipurile de la locusul K-cazeinei care conțin cel puțin o alelă B (BB sau AB) au avut o frecvență mare comparativ cu cele de tip AA. Acest lucru are o semnificație pozitivă deoarece genotipul BB și alela B a K-cazeinei au fost asociată la diferite rase de taurine cu o compoziție mai bună a laptelui sub aspectul conținutului de grăsime și proteină și cu randamente superioare de procesare, care în funcție de tipul de brânză fabricată poate varia între 2,7-6,2 %. La locusul beta-cazeinei frecvența genotipurilor homozigote A1A1 a fost mai mare comparativ cu cele A2A2. Acest lucru are o semnificație negativă deoarece proteina de tip A1 a fost asociată în unele studii cu unele boli cum ar fi: diabetul de tip 1, cardiopatia ischemică sau probleme de digestie.

La bubaline și ovine au fost identificate polimorfisme în regiunile alfa s1 cazeinei analizate în mod similar și în concordanță cu alte studii realizate în domeniu.

În concluzie, pentru îmbunătățirea compoziției laptelui și a randamentului de obținere al brânzeturilor recomandăm ca fermierii care dețin populațiile de caprine sau taurine care vor fi incluse în programul de colectare a laptelui în vederea procesării în brânzeturi să utilizeze la reproducție animale genotipate pentru acești markeri ADN și care să fie purtătoare ale alelelor și genotipurilor favorabile. Acest lucru ar duce la obținerea într-un timp mai scurt a unor animale producătoare de lapte cu calități superioare de procesare și implicit la rentabilizarea procesului de obținere al brânzeturilor. În același timp, pentru a produce un lapte mai sănătos recomandăm ca taurinele să fie genotipate pentru gena beta - cazeinei în scopul creșterii frecvenței alelei de tip A2.

9. Selectarea indivizilor cu potențial genetic valoros și dezvoltarea unei baze de date privind resursele genetice la nivel zonal

În baza rezultatelor obținute în cadrul acestui studiu au fost identificați și selectați indivizii cu potențial genetic valoros, care se încadrează în standardele de rasă la speciile de interes, prezintă însușiri fenotipice și genotipice favorabile, ce pot fi utilizați în scheme și programe de reproducție la speciile de interes, inclusiv de difuzare a materialului biologic pentru conservarea, valorificarea și promovarea raselor locale, respectiv Bălțata Românească (BR) și Bivolul Românesc (B) la bovine, Turcană la ovine și Carpatina la caprine. Datele de caracterizare genotipică, respectiv genotipurile identificate constituie o bază de date privind resursele genetice din zona Sâg, județul Sălaj.

Realizarea indicatorilor propuși pe întreaga perioadă de implementare a activității 2.2, respectiv *Cercetări privind valorificarea resurselor genetice* a fost susținută prin activități de informare și documentare, inclusiv activități consultative cu specialiști din domeniul zootehnic, asociații și organizații de profil, în vederea analizei situației efectivelor de animale la nivelul județului Sălaj și în special din zona Sâg. De asemenea au fost organizate întâlniri și ședințe de lucru pe teme conexe proiectului și specifice activităților desfășurate cu participarea activă a colectivului USAMV CN și grupului operațional.

10. Concluzii tehnice și recomandări

Rasele de taurine și bubaline din zona Sălaj prezintă însușiri valoroase ce au fost identificate prin utilizarea metodelor de genetică moleculară, în mod specific fiind identificate variante alelice și genotipuri favorabile pentru producția cantitativă și calitativă de lapte, dar și cu efect sanogen.

Pentru gena k-cazeinei recomandăm promovarea alelei B și a genotipurilor ce prezintă această alelă, respectiv genotipul homozigot dominant BB și genotipul heterozigot AB (optim fiind genotipul homozigot dominant BB), în

populațiile de animale, datorită faptului că proteina produsă în laptele acestor animale este asociată cu o compoziție mai bună a laptelui sub aspectul conținutului de grăsime și proteină, o cantitate mai mare de proteină în lapte, dar și cu un randament superior de procesare la obținerea brânzeturilor, ce poate rezulta în eficientizarea producției de brânzetururi (dependent de tipul de brânzetururi pot exista variații între 2,7-6,2 %).

Pentru gena beta-cazeinei recomandăm promovarea alelei A2 și a genotipurilor ce prezintă această alelă, respectiv genotipul homozigot dominant A2A2 sau genotipul heterozigot (optim fiind genotipul A2A2), în populațiile animale, datorită potențialului efect sanogen la om.

De asemenea recomandăm marcarea și etichetarea laptelui și a produselor lactate produse rezultate prin procesarea laptelui provenit de la animale purtătoare ale genotipurilor cu efect sanogen, urmând astfel modelul altor țări mai dezvoltate care au procedat deja la astfel de practici.

Indivizii purtători ai genotipurilor favorabile pentru producția cantitativă și calitativă a laptelui, destinat procesării pentru obținerea brânzeturilor ar trebui să fie utilizați în programe de selecție și la reproducție în vederea creșterii frecvenței alelelor de interes și a promovării genotipurilor dorite în populațiile de animale existente în zona Sâg din județul Sălaj, dar și în afara acestuia. Totodată se poate considera eliminarea de la reproducție a indivizilor purtători ai alelelor și genotipurilor cu impact negativ asupra calităților de procesare și asupra sănătății umane, dar și înlocuirea acestora cu indivizi cu un profil genetic favorabil.

Fermierii și procesatorii din industria laptelui ar trebui să țină cont de profilele moleculare favorabile pentru obținerea și prelucrarea unui lapte cu caracteristici superioare de procesare și cu efect sanogen pentru asigurarea creșterii eficacității de procesare și calității produselor obținute. Marcarea și etichetarea produselor în acest sens poate reprezenta o strategie demnă de luat în considerare și pentru promovarea acestor produse.

Potențialul genetic al resurselor animale din această zonă poate fi valorificat prin dezvoltarea unor programe de creștere și ameliorare specifice și adaptate practicii managementului în ferme mici. Mai mult, acest potențial poate fi valorificat prin scheme pentru sisteme de producție și procesare locale, specifice zonei Sălaj.

Concluziile tehnice și recomandările formulate în urma cercetărilor acestui studiu vor fi diseminate la finalul proiectului prin manifestări de profil și întâlniri organizate cu asociații ale crescătorilor de animale, fermieri, specialiști în domeniu și alte persoane interesate.

11. Prezentare rezultate verificabile – indicatori realizați

- ✓ Situația efectivelor de bovine aflate în control oficial pentru producția de lapte din județul Sălaj.
- ✓ Elementele de caracterizare a raselor la speciile vizate în proiect.
- ✓ Identificarea și caracterizarea indivizilor selectați din populațiile de animale de interes pentru prelevarea probelor biologice în vederea extracției și purificării ADN.
- ✓ Stabilirea condițiilor de prelevare și stocare a probelor biologice și punctele critice.
- ✓ Stabilirea tehnicilor de extracție, purificare și analiză moleculară a genelor codificatoare pentru proteine de interes din lapte.
- ✓ Rezultate ale analizelor de genotipizare.
- ✓ Stabilirea și caracterizarea profilelor moleculare de interes favorabile pentru proteinele din lapte în vederea obținerii unor producții lactate cu caracteristici superioare pentru procesare în vederea obținerii brânzeturilor și de calitate, sub aspect nutrițional și sanogen.
- ✓ „Ghid de bune practici pentru ameliorarea genetică a animalelor”.

- ✓ Concluzii tehnice și recomandări.
- ✓ Baza de date cu profilele genetice identificate ale resurselor animale studiate.
- ✓ Trei lucrări științifice publicate în jurnale științifice de specialitate recunoscute CNCIS la nivel național (cotație B+) și indexate în baze de date internaționale (BDI).

12. Concluzii

- ✓ În baza analizei datelor privind efectivele de animale din teren și al contextului tehnico-științific au fost identificate rasele și indivizii de interes pentru prelevarea probelor biologice în vederea efectuării extracției ADN și caracterizării genetice a indivizilor, în special a genelor de interes în vederea obținerii de produse lactate îmbunătățite sub aspect nutrițional și sanogen, astfel încât prezentul proiect să răspundă necesităților nutriționale atât la nivel național, cât și global.
- ✓ Prin analiza și caracterizarea raselor la speciile vizate în proiect au fost identificate animalele ce pot fi încadrate în standardele de rasă, respectiv indivizii valoroși din populațiile de animale din județul Sălaj, ce vor fi supuși testării în vederea identificării genotipurilor favorabile, care ulterior vor fi recomantate pentru a fi promovate.
- ✓ Au fost identificate condițiile de prelevare a probelor biologice pentru extracția ADN. De asemenea au fost stabilite punctele critice, ce pot influența calitatea ADN.
- ✓ Au fost stabilite tehnicile de extracție și purificare ADN, care vor fi considerate pentru genotipizare, ținând cont de avantajele acestor metode, dar și a echipamentelor și aparaturii existente în dotarea laboratoarelor.
- ✓ Au fost obținute rezultate ale analizelor de genotipizare pentru animalele luate în studiu.
- ✓ A fost constituită o bază de date privind animalele luate în studiu și genotipurile identificate.
- ✓ A fost elaborat materialul suport „Ghid de bune practici pentru ameliorarea genetică a animalelor” destinat asociațiilor de crescători de animale și fermierilor.
- ✓ Au fost formulate „Concluzii tehnice și recomandări” ce se doresc a fi diseminate la finalul proiectului în cadrul unor manifestări de profil și alte întâlniri în rândul crescătorilor de animale și a formelor asociative ale acestora.
- ✓ Au fost stabilite direcțiile principale de exploatare a resurselor genetice animale ce prezintă potențial genetic pentru obținerea unei producții de lapte îmbunătățită sub aspect nutrițional și sanogen, cu efecte benefice pentru sănătatea umană.
- ✓ Au fost publicate lucrări științifice, fiind vizate și alte materiale de specialitate în vederea valorificării și diseminării rezultatelor obținute în cadrul acestui proiect.

13. Bibliografie

1. Ali W.R., Amin I., Asif M., Mansoor S., 2019, Genotyping Test Development and Genotyping Survey of Pakistani population of Holstein Friesian imported from Different Origins for A1/A2 SNP in Beta-casein Gene, bioRxiv 720045; doi: <https://doi.org/10.1101/720045>
2. ANZ, 2020 - Buletin tehnic informativ - specia bovine - 31.03.2020, <http://www.anarz.eu/> (accessed on 03 august 2021)
3. Bâlțeanu V.A., Vlaic A., Suteu M., Carsai T.C., 2010. A comparative study of major milk protein polymorphism in six Romanian cattle breeds. Bulletin of UASVM-CN, Animal Sci. and Biotechnologies, 67: 345 - 350;
4. Bermejo, L.M.; López-Plaza, B.; Santurino, C.; Cavero-Redondo, I.; Gómez-Candela, C. Milk and Dairy Product Consumption and Bladder Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. Adv. Nutr. 2019, 10, S224–S238.

5. Boettcher PJ, Caroli A, Stella A, Chessa S, Budelli E, Canavesi F, Ghiroldi S, Pagnacco G. Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian Holstein and Brown Swiss cattle. *J Dairy Sci.* 2004 Dec;87(12):4311-7. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73576-6. PMID: 15545395.
6. Coroian A., Mireșan V., Coroian C.O., Feștilă I., Cocan D., Răducu C., Dărăban S., Production Parameters in a Romanian Buffalo Population, *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 2012, 45 (2): 301-304.
7. de Oliveira LSM, Alves JS, Bastos MS, da Cruz VAR, Pinto LFB, Tonhati H, Costa RB, de Camargo GMF. Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) only have A2A2 genotype for beta-casein. *Trop Anim Health Prod.* 2021 Jan 28;53(1):145.
8. Delacroix-Buchet A., Degas C., Lamberet G., Vassal I., 1996. Influence des variants AA et FF de la caséine α 1 caprine sur le rendement fromager et les caractéristiques sensorielles des fromages. *Lait*, 76: 217-241;
9. Díaz E., Angulo-Heras C., Jordana J., Amills M., Sánchez A., Serradilla J.M., 1994. Casein variation in one Spanish breed of goats and its relation with production traits. In: *Book of Abstracts of 45th Annual Meeting of EAAP*, Edinburgh (United Kingdom): 296;
10. ESTAT, Portrait of the Regions - ROMANIA - SALAJ COUNTY - Geography and history, https://circabc.europa.eu/webdav/CircaBC/ESTAT/regportraits/Information/ro066_geo.htm, (accessed on: 29 October 2021).
11. Fan X, Gao S, Fu L, Qiu L, Miao Y. Polymorphism and molecular characteristics of the *CSN1S2* gene in river and swamp buffalo. *Arch Anim Breed.* 2020 Sep 18;63(2):345-354.
12. FAO (Ed.) *The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*; Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2015; ISBN 978-92-5-108820-3.
13. FAO, 2011, Draft guidelines for the cryoconservation of animal genetic resources, www.fao.org/docrep/meeting/022/mb553e.pdf
14. Fitzgerald R. J., Hill J. P., 1997. The relationship between milk protein polymorphism and the manufacture and functionality of dairy products. In: *Milk Protein Polymorphism*, International Dairy Federation, Brussels: 355–371
15. Hayes H., Petit E., Bouniol C., Popescu P., 1993a. Localisation of the alpha-S2- casein gene (*CASAS2*) to the homologous cattle, sheep and goat chromosome 4 by in situ hybridisation. *Cytogenet. Cell Genet.*, 64:282–285;
16. Hayes H.C., Petit E.J., 1993b. Mapping of the β -lactoglobulin gene and immunoglobulin M heavy chain-like sequence to the homologous cattle, sheep and goat chromosomes. *Mammalian Genome*, 4: 207-210;
17. Hoffmann I., 2010, Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic. *Animal genetics*, 41 s1, pp. 32-46
18. Jakob E., 1994. Genetic polymorphism of milk proteins. *Bull. Int. Dairy Fed.*, 298:17-27;
19. Jinsmaa Y., Yoshikawa M., 1999. Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein. *Peptides*, 20:957-962;
20. Jurcă I.M., 1998. *Laptele și produsele lactate*. Ed. ICPIAF, Cluj-Napoca;
21. Kamiński S., Cieślińska A., Kostyra E., 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J. Appl. Genet.*, 48: 189-198;
22. Kost N.V., Sokolov O., Oksana Yu, Kurasova B. A., Dmitriev D., Julia N., Tarakanova M., Gabaeva V., Yuriy A., Zolotarev A., Dadayan K., Sergei A., Ekaterina V., Korneeva I., Mikheeva G., Andrey A., Zozulya A., 2009. β -Casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides*, 30:1854-1860;
23. Kubarsepp I., Henno M., Viinalass H., Sabre D., 2005. Effect of k-casein and β -lactoglobulin genotypes on the milk rennet coagulation properties. *Agronomy Research*, 3: 55-64;
24. Leischner C, Egert S, Burkard M, Venturelli S. Potential Protective Protein Components of Cow's Milk against Certain Tumor Entities. *Nutrients.* 2021 Jun 8;13(6):1974.
25. Meggiolaro D., Crepaldi P., Verdoggia L., Marilli M., Cicogna M., 2000. Preliminary study on alpha s1-casein polymorphism in Val di Livo goats. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 26: 149-152;

26. Meier, S., Korcuć, P., Arends, D., Brockmann, G. A. (2019). DNA Sequence Variants and Protein Haplotypes of Casein Genes in German Black Pied Cattle (DSN). *Frontiers in genetics*, 10, 1129. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01129>
27. Molkhou P., 2006. Actualité sur l'allergie et l'intolérance aux protéines lactées. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 19: 119-130;
28. Oberritter H., Schäbenthal K., von Ruesten A., Boeing H. The DGE Nutrition Circle—Presentation and Basis of the Food-Related Recommendations from the German Nutrition Society (DGE) *Ernaehrungs Umsch. Int.* 2013:24–29.
29. Oloffs K., Schulte-Coerne H., Pabst K, Gravert H. O., 1992. Die Bedeutung der Proteinvarianten für genetische Unterschiede in der Käseeritaughlichkeit der Milch. *Züchtungskunde*, 64:20-26;
30. Park, Y.W.; Haenlein, G.F.W. Therapeutic and Hypo-Allergenic and Bioactive Potentials of Goat Milk, and Manifestations of Food Allergy. In *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, 2nd ed.; Park, Y.W., Haenlein, G.F.W., Wendorff, W.L., Eds.; Wiley-Blackwell Publishers: Oxford, UK, 2017; pp. 151–180.
31. Park, Y.W.; Nam, M.S. Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Food Sci. Anim. Resour.* 2015, 35, 831–840.
32. Pirisi A, Piredda G., Papoff C.M., Di Salvo R., Pintus S., Garro G., Ferranti P., Chianese L., 1999. Effects of sheep alpha s1-casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties. *J. Dairy Res.*, 66:409-419.
33. Priyadarshini, P.; Mishra, C.; Mishra, B.; Swain, K.; Rout, M.; Mishra, S.P. Impact of milk protein on human health: A1 verses A2. *IJCS* 2018, 6, 531–535.
34. Socol Claudia Terezia, Maurescu Cristina, Trif Monica, Criste Florin Leontin, Rusu Alexandru Vasile, 2019, Genomic selection in livestock improvement – a brief overview of dairy cattle, *Analele Univ. din Oradea, Fascicula: Ecotox. Zoteh. Teh. Ind. Alim.*, vol. XVIII/B, 243-250
35. Soulier S., Mercier J.C., Vilotte J.L., Anderson J., Clark A.J., Provot C., 1989. The bovine and ovine genomes contain multiple sequences homologous to the alpha-lactalbumin-encoding gene. *Gene*, 83: 331-338;
36. STATISTICA, 2021, Number of cattle in Romania as of June 1, 2020, by region, <https://www.statista.com/statistics/1183249/romania-number-of-cattle-by-region/>
37. Strucken, E.M., Gebrehiwot, N.Z., Swaminathan, M. et al. Genetic diversity and effective population sizes of thirteen Indian cattle breeds. *Genet Sel Evol* 53, 47 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12711-021-00640-3>
38. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.
39. Threadgill D.W., Womack J.E., 1990. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Research*, 18: 6935-6942;
40. Tricarico J.M., Kebreab E., Wattiaux M.A., 2020, MILK Symposium review: Sustainability of dairy production and consumption in low-income countries with emphasis on productivity and environmental impact, *Journal of Dairy Science*, ISSN: 0022-0302, 103(11), 9791-9802, doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18269>
41. Van den Berg G., Escher J.T.M., Koning P. J., Bovenhuis H., 1992. Genetic polymorphism of K-casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. *Neth. Milk Dairy J.* 46: 145;
42. Vanvanhossou SFU, Dossa LH, König S. Sustainable Management of Animal Genetic Resources to Improve Low-Input Livestock Production: Insights into Local Beninese Cattle Populations. *Sustainability.* 2021; 13(17):9874. <https://doi.org/10.3390/su13179874>
43. Vilotte J.L., Soulier S., Mercier J.C., Gaye P., Hue-Delahaie D., Furet J.P. , 1987. Complete nucleotide sequence of bovine α -lactalbumin gene. Comparison with its rat counterpart. *Biochimie*, 69: 609-620
44. Walsh C. D., Guinee T. P., Reville W. D., Harrington D., Murphy J. J., O'Kennedy B. T., Fitzgerald R. J., 1998. Influence of kappa-casein genetic variant on rennet gel microstructure, cheddar cheesemaking properties and casein micelle size. *Int. Dairy J.*, 8: 707–714;
45. Woelders H., Zuidberg C. A., Hiemstra, S. J., 2006 Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poultry Science* 85:216–222.