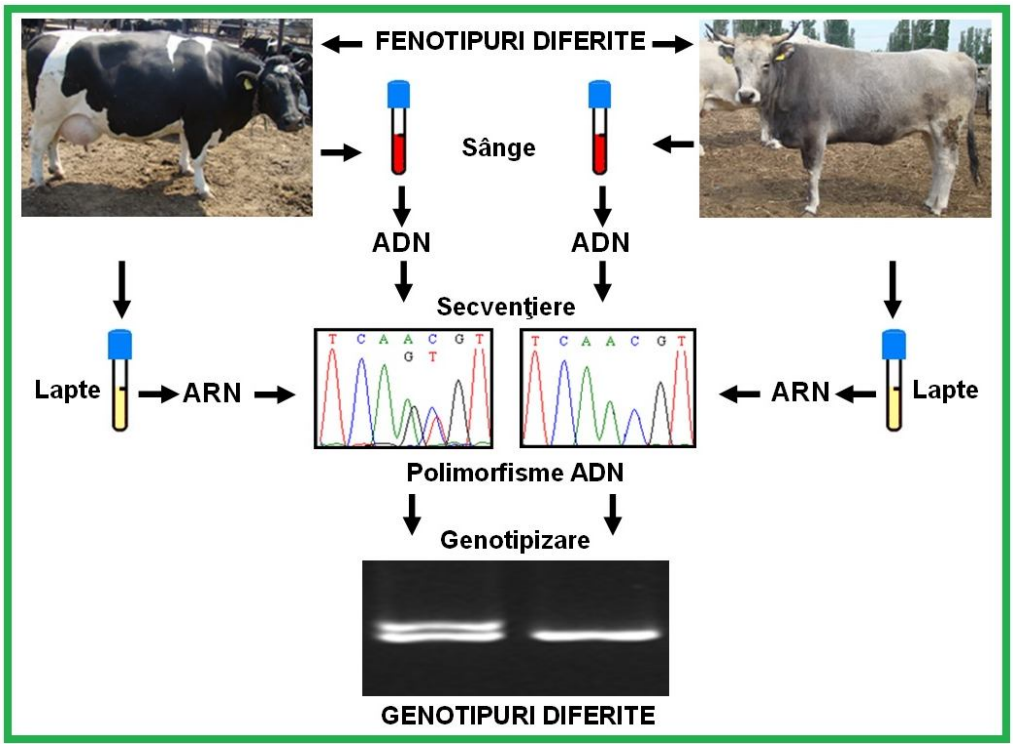
**Dr. Ing. Biol. Chim.**
**Valentin Adrian BÂLTEANU**

**Dr. Ing.**
**Teodora Crina CARȘAI**

# DE LA RUSTIC LA AMELIORAT: STUDIUL POLIMORFISMELOR UNOR GENE CHEIE IMPLICATE ÎN DEZVOLTAREA ȘI CAPACITATEA LACTOGENĂ A GLANDEI MAMARE LA TAURINELE DIN RASELE BALȚATĂ CU NEGRU ROMANEASCĂ ȘI SURA DE STEPĂ




BioFlux

**Cluj-Napoca 2013**

**Dr. Ing. Biol. Chim.**
**Valentin Adrian BÂLTEANU**

**Dr. Ing.**
**Teodora Crina CARȘAI**

# DE LA RUSTIC LA AMELIORAT: STUDIUL POLIMORFISMELOR UNOR GENE CHEIE IMPLICATE ÎN DEZVOLTAREA ȘI CAPACITATEA LACTOGENĂ A GLANDEI MAMARE LA TAURINELE DIN RASELE BALȚATĂ CU NEGRU ROMANEASCĂ ȘI SURA DE STEPĂ

ISBN 978-606-8191-52-2

BioFlux

**Cluj-Napoca 2013**

# CUPRINS

Pg.

**Introducere** 5

**CAPITOLUL 1: Substratul genetic al dezvoltării și funcționării glandei mamare la taurine.....** 10

1.1. Gene cheie implicate în dezvoltarea, funcționarea și capacitatea lactogenă a glandei mamare..... 10

1.2. Activarea expresiei genelor în glanda mamară sub influența hormonilor lactogeni și sinteza componenților laptelui..... 15

1.3. Polimorfisme identificate în structura acestor gene și asocierea lor cu cantitatea și calitatea laptelui la taurine..... 18

**CAPITOLUL 2: Metodologia de lucru folosită pentru evidențierea polimorfismelor genetice ale celor 10 gene cheie implicate dezvoltarea și capacitatea lactogenă a glandei mamare la indivizi din rasele Balțată cu Negru Românească (Holstein Friză) și Sura de Stepă, varietatea Moldovenească.....** 22

2.1. Identificarea fermelor de taurine şi nominalizarea indivizilor pentru studiu din rasele de taurine Balțată cu Negru Românească și Sura de Stepă..... 22

2.2. Amplificarea regiunilor codificatoare din structura genelor care codifică PIT1, GH și PRL la indivizi din rasele Balțată cu Negru Românească și Sura de Stepă..... 24

2.3. Amplificarea regiunilor codificatoare din structura genelor care codifică IGF1, PRLR, GHR, STAT5A, DGAT1, GALT și LALBA la indivizi din rasele Balțată cu Negru Românească și Sura de Stepă..... 27

2.4. Secvențierea produșilor de amplificare obținuți din regiunile codificatoare ale celor 10 gene luate în studiu, analiza și interpretarea cromatogramelor de secvențiere..... 30

2.5. Genotipizarea prin PCR-RFLP la cei 10 loci a celor două rase de taurine și stabilirea structurii genetice în populațiile analizate..... 31

**CAPITOLUL 3: Rezultate privind polimorfismele genetice evidențiate în cele 10 gene studiate la indivizii din rasele Balțată cu Negru Românească și Sura de Stepă..... 38**

3.1. Rezultate privind cuantificarea probelor de ADN și ARN extrase din probele biologice recoltate..... 38

3.2. Rezultate privind mutațiile evidențiate prin amplificarea și secvențierea regiunilor exonice codificatoare și a regiunilor intronice flancatoare ale genelor PIT1, GH și PRL..... 41

3.3. Rezultate privind mutațiile evidențiate prin amplificarea și secvențierea cADN-urilor conținând regiunile exonice codificatoare obținute din genele IGF1, PRLR, GHR, STAT5A, DGAT1, GALT și LALBA..... 43

3.4. Rezultate privind genotipizarea la cei 10 loci și stabilirea structurii genetice în loturile de taurine analizate din rasele Balțată cu Negru Românească și Sura de Stepă..... 46

3.5. Rezultate privind estimarea influenței pe care o au combinațiile alelice întâlnite la cei 10 loci asupra capacității lactogene a glandei mamare la cele două rase de taurine..... 61

**CONCLUZII……** 71

**Bibliografie.....** 75

# Introducere

În ultimii ani interesul privind determinismul genetic al dezvoltării și funcționării glandei mamare la diverse specii de animale și la om, precum și implicațiile unor polimorfisme genetice de la unii loci ce codifică hormoni, factori de transcripție sau enzime asupra lactației, a crescut foarte mult.

Lactogeneza poate fi împărțită în două faze:

- **faza 1 -** care începe în ultima treime a gestației în care au loc procese de diferențiere structurale și funcționale ale epiteliului mamar secretor;
- **faza 2** - care începe imediat după naștere și implică finalizarea diferențierii celulare și coincide cu sinteza și secreția laptelui în cantități semnificative. Aceste două faze sunt esențiale având ca efect final declanșarea lactației (Balteanu, 2010a).

Dezvoltarea unor noi tehnologii în domenii ca genomică, transcriptomică, proteomică a dus la identificarea unor mecanisme genetice intime care controlează proliferarea celulelor epiteliale din glanda mamară și capacitatea lor secretoare (Balteanu, 2010a). Înțelegerea mai profundă a acestor mecanisme genetice a căpătat în ultima vreme o miză și mai mare deoarece ameliorarea cantității și calității laptelui la speciile de fermă nu trebuie să compromită sănătatea, reproducția sau longevitatea animalului (Carsai și colab., 2010a).

Lactația sub toate aspectele ei este un caracter controlat poligenic, ceea ce înseamnă că în dezvoltarea și funcționarea glandei mamare intervin o multitudine de gene. Efectul multora dintre aceste gene luat singular este mic, dar sutele de gene implicate în determinismul genetic al acestui caracter au un efect final aditiv mare. Din multitudinea de gene implicate în determinismul genetic al lactației doar o mică parte joacă un rol central, fiind esențiale pentru buna dezvoltare și funcționare a glandei mamare.

Aceste gene cheie codifică:

- **factori de transcripție**: factorul de creștere pituitar (PIT1), care activează transcripțional genele ce codifică hormonii lactogeni;
- **hormoni lactogeni**: hormonul de creștere (GH) și prolactina (PRL), care coordonează dezvoltarea și activitatea secretoare a glandei mamare;
- **factori de creștere**: factorul de creștere insulin-like 1 (IGF1), care stimulează diviziunea și proliferarea epiteliului mamar secretor;
- **receptori ai hormonilor:** receptorul pentru prolactină (PRLR) și receptorul pentru hormonul de creștere (GHR), care sunt proteine transmembranare implicate captarea semnalelor hormonale;
- **factori implicați în transducerea semnalelor hormonale și activarea transcripțională a unor gene:** factorul 5 de transmitere a semnalului și activare a transcripției (STAT5A), care este principalul mesager al semnalelor PRL și GH la promotorii genelor ce codifică proteinele majore din lapte și la promotorii altor gene implicate în sinteza componenților laptelui;
- **enzime cheie** care sunt implicate în sinteza grasimilor din lapte: acilCoA diacilglicerol aciltransferaza 1 (DGAT1) sau a lactozei: ß1,4 galactoziltransferaza (GALT) și alfa-lactoalbumina (LALBA), care formează prin asociere enzima lactoz-sintetază.

Mutațiile care au apărut în structura acestor gene de-a lungul timpului au dus la apariția mai multor alele la acești loci (Balteanu, 2010a). Aceste variații, denumite generic polimorfisme alelice, sunt cauzate de restructurări ale genelor (substituția unor nucleotide, deleții, inserții etc), care pot avea ca efect: modificarea nivelului de expresie al genei implicate, modificarea compoziției în aminoacizi a proteinei codificată de genă (cu repercursiuni asupra conformației și activității ei biologice de hormon, receptor sau enzimă) sau fară efect marcant daca aceste mutații sunt localizate în introni (Balteanu, 2010a), cu excepția celor localizate în situsurile de splicing (Balteanu și colab., 2013).

Ca urmare o parte din mutațiile (variații aleleice) apărute în structura acestor gene raspunzătoare de dezvoltarea și funcționarea glandei mamare, gene care codifică hormoni, factori de creștere, factori de transcripție sau enzime, pot determina modificări în timpul oricarei faze a lactației și pot avea un efect pozitiv sau negativ asupra dezvoltării glandei mamare, capacității ei lactogene și implicit asupra producției cantitative și calitative de lapte (Balteanu, 2010a).

O serie de studii realizate pe diverse rase de taurine au fost focalizate pe evaluarea efectului individual al polimorfismului câtorva din acești loci asupra cantității și calității laptelui. Rezultatele au fost de multe ori contradictorii lucru influențat în principal de luarea în considerare în majoritatea studiilor de asociere a numai uneia sau două dintre aceste gene pe aceeași populație.

Cercetările realizate în cadrul proiectului RU/ISI 113/2010-2013 cu titlul ***„De la rustic la ameliorat: Studiul polimorfismelor unor gene cheie implicate în dezvoltarea și capacitatea lactogenă a glandei mamare la taurine și caprine''***, au avut scop decelarea mai precisă a substratului genetic care stă la baza variațiilor privind gradul de dezvoltare al glandei mamare și a capacității ei lactogene la taurine, variații care apar frecvent între rase diferite, dar și în cadrul aceleași rase. Spre deosebire de alte studii realizate pe diverse rase de taurine din lume, care au vizat studierea polimorfismului uneia sau două gene din cele menționate pe aceeași populație și pe indivizi relativi omogeni în ceea ce privește acest caracter, în cadrul proiectului am studiat polimorfismul combinat a celor 10 gene cheie pe aceeași indivizi din două rase diferite.

Pentru realizarea studiului au fost alese două rase de taurine aflate la extreme în privința gradului de dezvoltare al glandei mamare și al producției cantitative și calitative de lapte. În acest scop au fost organizate trei loturi experimentale:

- **Lotul 1 BNR-M** compus din indivizi din rasa de taurine Balțată cu Negru Românească (Holstein Friză) cu o glandă mamară bine dezvoltată și cu producție foarte mare de lapte de peste 10.000l/lactație;
- **Lotul 2 BNR-S** compus din indivizi din rasa de taurine Balțată cu Negru Românească (Holstein Friză) cu o glandă mamară mai slab dezvoltată și cu producție mai mica de lapte de sub 6000l/lactație;
- **Lotul 1 SS** compus din indivizi din rasa de taurine Sura de Stepă, varietatea Moldovenească, rasă ancestrală cu o glandă mamară foarte slab dezvoltată și cu producție foarte mica de lapte de 1000-1500l/lactație.

Prin acest studiu am vizat evidențierea variabilității genetice la cei 10 loci în cadrul aceleași rase prin luarea în studiu a două loturi de indivizi din rasa Balțată cu Negru Românească care au prezentat diferențe fenotipice marcante pentru cele două caractere (loturile BNR-M și BNR-S), dar și a variabilității genetice dintre rase prin luarea în studiu ca rasă ancestrală model a unor indivizi din rasa Sura de Stepă, varietatea Moldovenească (lotul SS).

Alegerea celor 10 gene pentru a fi investigate în studiul nostru a avut ca motivație fapul că ele reprezinta actorii cei mai importanți care controlează lactația sub toate aspectele ei și anume: creșterea și diferențierea structurală și funcțională a epiteliului mamar secretor, declanșarea lactației și sinteza componenților laptelui, menținerea secreției lactate și apoi intrarea în repaus a glandei mamare.

Polimorfismele genetice din structura acestor 10 gene cheie evidențiate în urma studiului realizat și combinațiile alelice diferite observate la indivizii din cadrul aceluiași lot, dar mai ales între loturi, ar putea explica variabilitea constatată la cele două rase de taurine studiate în ceea ce privește gradul de dezvoltare al glandei mamare și capacitatea ei lactogenă, ceea ce are implicații directe asupra producției cantitative și calitative de lapte.

Informațiile genetice obținute în cadrul studiului și metodologia de lucru aplicată vor oferi posibilitatea unei estimări mai precoce a valorii de ameliorare a reproducătorilor înainte ca acest caracter să se exprime fenotipic și va duce cu siguranță la accelerarea câștigului genetic dacă selecția pentru acești markeri va fi implementată în schemele clasice de ameliorare.

**Aknowledgments:** Cercetările sintetizate în această carte s-au desfășurat în cadrul Laboratorului Zonal de Genotipizare a Animalelor, Institutul pentru Științele Vieții din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca. Aceste cercetări au fost realizate în cadrul proiectului RU/ISI 113/2010-2013 cu titlul ***„De la rustic la ameliorat: Studiul polimorfismelor unor gene cheie implicate în dezvoltarea și capacitatea lactogenă a glandei mamare la taurine și caprine''*** și au fost finanțate de către Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior și a Cercetării (UEFISCDI) România în cadrul proiectelor de tip Resurse Umane.

# CAPITOLUL 1

# Substratul genetic al dezvoltării și funcționării glandei mamare la taurine

## 1.1. Gene cheie implicate în dezvoltarea, funcționarea și capacitatea lactogenă a glandei mamare

**Factorul de creștere pituitar (PIT1** sau **POU1F1)** este o proteină alcătuită din 291 aminoacizi cu o greutate moleculară de 34 kDa; gena care îl codifică este localizată la taurine pe cromozomii din perechea 1 (Moody și colab., 1995; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

PIT1 este un factor de transcripție sintetizat în hipotalamus, fiind esențial pentru dezvoltarea glandei hipofize și expresia genelor care codifică hormonii produși în hipofiza anterioară la mamifere, printre care prolactina și hormonul de creștere (Bona și colab., 2004). PIT1 este implicat și în reglarea expresiei genei ce codifică subunitatea beta a hormonului eliberator de tirotropină (TSH), un hormon esențial pentru activitatea glandei tiroide. Mutațiile în structura genei PIT1 se manifestă prin deficiențe ale sintezei hormonului de creștere, prolactinei și hormonului eliberator de tirotropină (Radovick și colab., 1992), de aceea este considerat la ora actuală un marker genetic extrem de valoros în ameliorarea producțiilor animalelor (Renaville și colab., 1997).

**Hormonul de creștere** sau **somatotrop (GH** sau **STH)** este un hormon proteic alcătuit din 191 aminoacizi cu o greutate moleculară de 22,1 kDa; gena care îl codifică este localizată la taurine pe cromozomii din perechea 19 (Hediger și colab., 1990; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

GH este sintetizat, stocat și secretat de către celulele somatotrope din lobul anterior al glandei hipofize sub controlul PIT1 (Bona și colab., 2004) și face parte dintr-o familie multiplă de gene, alături de prolactină și hormonii lactogeni placentari. GH stimulează creșterea și diviziunea celulelor, fiind un reglator

major al metabolismului. În glanda mamară hormonul de creștere stimulează indirect proliferarea celulelor epiteliale secretoare prin activarea expresională a genei ce codifică factorul de creștere epitelial insulin-like 1 (IGF1).

Administrarea de GH la taurine determină imediat o creștere semnificativă a cantității circulante din sânge de IGF1, corelată cu o proliferare masivă a celulelor epiteliale mamare secretoare la vacile aflate în lactație și implicit creșterea cantității laptelui cu 10-15% (Zhou și colab., 2008). GH are și un efect stimulativ direct asupra sintezei componenților laptelui prin activarea și stimularea activității genelor care codifică proteinele majore din lapte, ceea ce explică menținerea constantă a calității laptelui în urma tratamentelor cu acest hormon. Stimularea expresiei genei LALBA, componenta cheie a enzimei lactoz-sintetază, stimulează sinteza de lactoză care este corelată cu o creștere a cantității de lapte (Yang și colab., 2005; Zhou și colab., 2008).

**Factorul de creștere insulin-like 1 (IGF1)** este un hormon proteic alcătuit din 70 de aminoacizi cu o greutate moleculară de 7,5 kDa, fiind asemănător cu insulina; gena care îl codifică este localizată la taurine pe cromozomii din perechea 5 (Bishop și colab., 1991; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

IGF1 este produs în principal în ficat prin acțiunea directă a GH, fiind mediatorul primar al efectelor acestui hormon în țesuturi (Plath-Gabler și colab., 2001). IGF1 este unul dintre cei mai potenți activatori ai stimulării creșterii și proliferării celulare și un inhibitor potent al apoptozei (moartea celulară). Este produs pe toată perioada vieții nivelul lui atingând cote maxime în perioada pubertății. Efecte lui de stimulare a diviziunii și diferențierii celulare se repercutează asupra fiecarei celule din corp. IGF1 este produs local și în glanda mamară (prin acțiunea directă a hormonului de creștere), unde stimulează împreună cu hormonii estrogeni dezvoltarea canalelor galactofore și creșterea epiteliului mamar prin stimularea diviziunilor celulare și inhibarea apoptozei (Plath-Gabler și colab., 2001).

**Prolactina (PRL)**, cunoscută și sub denumirea de **hormonul luteotrop** sau **lactotrop (LTH)**, este un hormon proteic alcătuit din 199 aminoacizi cu o greutate moleculară de 24kDa; gena care îl codifică este localizată la taurine pe cromozomii din perechea 23 (Hallerman și colab., 1988; Barendse și colab., 1997; http://www.ncbi.nlm.nih. gov/genbank/).

PRL este sintetizată și secretată de către celulele lactotrope din lobul anterior hipofizar, dar este produsă în cantități mici și în alte țesuturi incluzând glanda mamară (Le Provost și colab., 1994). Împreună cu GH, PRL stimulează creșterea și dezvoltarea țesutului mamar, declanșarea și menținerea lactației și sinteza componenților laptelui prin reglarea expresiei genelor care codifică cele 6 proteine majore din lapte și a unor gene implicate în sinteza lactozei și a grăsimilor. Creșterea concentrației serice de PRL circulantă în timpul sarcinii duce la creșterea și diferențierea tesutului lactogen din glanda mamară, care este corelată după naștere cu o creștere a producției de lapte. Activarea genei care codifică PRL se face sub influența factorului de transcripție PIT1, care se leagă de promotorul genei și favorizează astfel expresia ei în glanda hipofiză.

**Receptorul pentru prolactină (PRLR)** și **receptorul pentru hormonul de creștere (GHR)** sunt proteine transmembranare cu rol esențial în preluarea și transmiterea mai departe a semnalelor prolactinei, respectiv ale hormonului de creștere, la factorii de transcripție citoplasmatici din familia STAT5. Genele care codifică cei doi receptori sunt localizate la taurine pe cromozomii din perechea 20 una în vecinătatea celeilalte (Georges și colab., 1995; Arranz și colab., 1998; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Aceste două gene se exprimă specific în toate țesuturile țintă unde acționează cei doi hormoni, cu precădere în glanda mamară în cazul receptorului pentru prolactină, respectiv în ficat și în glanda mamară în cazul receptorului pentru hormonul de creștere. Ambii receptori prezintă trei domenii: extracelular (prin care se cuplează de hormonii ai căror efect îl mediază), transmembranar și

intracelular (prin care interacționează cu factorul STAT5A). Legarea prolactinei și a hormonului de creștere de receptorii lor specifici cauzează homodimerizarea lor, ceea ce determină activarea prin fosforilare a factorului STAT5A care are localizare intracelulară (Herrington și colab., 2001).

**Factorul 5 de transmitere a semnalului și activare a transcripției (STAT5)** este o proteină intracelulară identificată prima dată în glanda mamară în lactație, ulterior fiind identificat și în alte țesuturi. Au fost identificate două forme proteice ale acestui factor denumite STAT5A și STAT5B, care prezintă o omologie de 93% în ceea ce privește secvența aminoacizilor. Ei sunt codificați de două gene extrem de similare ca structură (Darnell și colab., 1997) și aflate una în vecinătatea celeilalte pe cromozomii din perechea 19 de la taurine (Seyfert și colab., 2000; Moleenar și colab., 2000; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ genbank/). Gena care codifică factorul STAT5A se exprimă în toate stadiile dezvoltării glandei mamare și prezintă puține modificări ale profilului său de expresie în aceste stadii.

În celula epitelială a glandei mamare factorul STAT5A are un rol dublu. El are rol de mediator intracelular esențial al transmiterii semnalelor prolactinei în nucleul celulei, unde prin legarea de regiuni specifice din promotorii genelor care codifică proteinele majore din lapte determină activarea lor transcripțională (Wakao și colab., 1994). De asemenea este mediatorul principal al acțiunii hormonului de creștere asupra unor gene țintă (Argetsinger și colab., 1996). El mediază sub influență hormonală și activarea transciptională a unor gene implicate în sinteza grăsimilor, lactozei și altor componenți ai laptelui.

**AcilCoA diacilglicerol aciltransferaza 1 (DGAT1)** este o proteină cu rol enzimatic alcătuită dintr-un lanț polipeptidic de 425 de aminoacizi, cu o greutate moleculară de 47 kDa; gena care o codifică este localizată la taurine pe cromozomii din perechea 14 (Coppieters și colab., 1998; Riquet și colab., 1999; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ genbank/).

În lapte grăsimile sunt prezente sub forma unor globule mici sferice sau eliptice alcătuite din trigliceride, care reprezintă 98-99% din totalul grăsimilor. Sinteza lor în glanda mamară în lactație este catalizată de către enzima cheie DGAT1 (Winter și colab., 2002). Acest proces metabolic esențial are loc în reticolul endoplasmatic neted unde această enzimă folosește ca substrat pentru sinteza lor diacilglicerolul și acetil coenzima A. DGAT1 este principala enzimă implicată și în sinteza trigliceridelor din adipocite (Kuhn și colab., 2004).

**Alfa-lactoalbumina (LALBA)** este o proteină majoră din lactoserm și reprezintă aproximativ 5% din totalul proteinelor din lapte (Balteanu, 2010a). Este alcătuită din 123 de aminoacizi cu o greutate moleculară de 14,175 kDa și prezintă un grad mare de omologie cu lizozimul; gena care o codifică este localizată la taurine pe cromozomii din perechea 5 (Soulier şi colab., 1989; Vilotte şi colab., 1987; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) și este activă doar în celulele epiteliale mamare secretoare.

LALBA este și un constituent de bază al enzimei lactoz-sintetază. Odată sintetizată proteina trece prin membrana aparatului Golgi interacționează cu ß1,4 galactoziltransferaza și formează enzima lactoz-sintetază (Shaper și colab., 1998).

**ß1,4 Galactoziltransferaza (GALT)** este o glicoproteină care prezintă la rumegătoare două izoforme care rezultă prin procesarea diferențiată a ARN-ului mesager (Russo și colab., 1990). Forma lungă este alcătuită din 402 aminoacizi iar forma scurtă este alcătuită din 389 aminoacizi, ambele forme având un domeniu catalitic terminal identic. Gena care o codifică este localizată la taurine pe cromozomii din perechea 8 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Enzima este întâlnită în toate țesuturile și este localizată în celulă doar pe suprafața internă a membranei aparatului Golgi. În absența LALBA (o proteină din lapte sintetizată doar în glanda mamară în lactație) enzima GALT participă

în celule la sinteza glicoproteinelor prin adăugarea galactozei la complexul oligozaharidic al proteinelor glicozilate.

În celulele epiteliale secretoare ale glandei mamare în lactație GALT interacționează cu LALBA și formează enzima lactoz-sintetază, o enzimă complexă în care GALT este partea ei catalitică iar LALBA nu are acțiune catalitică. Această asociere determină modificarea specificității de substrat a GALT, ea fiind subunitatea activă a enzimei lactoz-sintetază responsabilă de sinteza lactozei în glanda mamară. Reacția are loc prin transferul unei molecule de galactoză la glucoza liberă în urma căreia rezultă lactoză (Shaper și colab., 1998; Ramakrishnan și colab., 2002).

## 1.2. Activarea expresiei genelor în glanda mamară sub influența hormonilor lactogeni și sinteza componenților laptelui

Mecanismele prin care unii factori proteici (factori hipotalamici eliberatori de hormoni, hormoni, receptori, factori de transcripție, enzime) concură la inducerea diferențierii celulelor epiteliale mamare, declanșării activității lor secretoare și a activității expresionale a genelor responsabile direct sau indirect de sinteza componenților laptelui sunt cunoscute dar nu în detaliu (Carsai și colab., 2010b).

Sistemul endocrin, în principal prin glanda hipofiză, joacă un rol central în toate aspectele care implică dezvoltarea glandei mamare, lactația și menținerea ei și apoi intrarea în repaus mamar (Balteanu, 2010a). Activitatea secretoare a glandei hipofize este supracoordonată de către creier prin intermediul unor factori de transcripție și eliberare a hormonilor hipofizari. Unul dintre aceștia este PIT1, un factor proteic cheie sintetizat în nucleii hipotalamici și care determină în adenohipofiză activarea expresională a genelor care codifică GH și PRL, hormoni esențiali pentru dezvoltarea țesutului mamar (mamogeneză),

declanșarea lactației și sinteza laptelui (lactogeneză), menținerea secreției lactate (galactopoieză) și intrarea în repaus a glandei mamare (Carsai și colab., 2010b).

Eliberați în sânge acești doi hormoni lactogeni acționează în mod direct asupra activității secretoare a glandei mamare prin legare de receptorii lor proteici specifici din membrana celulelor epiteliale mamare secretoare țintă: receptorul pentru prolactină (PRLR) și receptorul pentru hormonul de creștere (GHR). În cazul GH, acesta acționează asupra glandei mamare și printr-un mecanism indirect prin stimularea în ficat a sintezei factorului proteic de creștere IGF1, care are efect proliferativ asupra epiteliului mamar secretor (Carsai și colab., 2010b).

Această legare a celor doi hormoni de receptorii lor specifici determină dimerizarea receptorilor, ceea ce induce activarea prin fosforilare a factorului STAT5A care este atașat de domeniul intracelular al acestor doi receptori. Prin activare acesta ajunge în nucleu unde se leagă de regiuni specifice din promotorii mai multor gene, printre care și genele care codifică proteinele majore din lapte, determinând activarea lor transcripțională și sinteza proteinelor specifice din lapte.

În lapte întâlnim șase tipuri de proteine majore care sunt codificate de șase gene nealele ce se exprimă specific în celulele epiteliale secretoare ale glandei mamare în lactație (Balteanu, 2010a; Balteanu și colab., 2010b). O parte din ele formează cazeina totală constituită din: alfa S1-cazeină, beta-cazeină, alfa S2-cazeină și K-cazeină. Din totalul proteinelor din lapte fracțiunea cazeinică reprezintă 80% la vacă, 85% la bivoliță, 82% la oaie și 77% la capră. De proporția fracțiunii cazeinice din lapte depind proprietățile sale de prelucrare, cantitatea și calitatea brânzei obținute, textura și gustul diferitelor sortimente de brânzeturi și produse lactate (Balteanu, 2010a; Balteanu și colab., 2010b). Proteinele din zer sunt reprezentate de beta-lactoglobulină și alfa-lactoalbumină

și reprezintă 20% la vacă, 15% la bivoliță, 18% la oaie și 23% la capră (Balteanu, 2010a).

GH și PRL influențează și sinteza grăsimilor din glanda mamară prin reglarea expresiei genei care codifică enzima DGAT1, enzimă cheie implicată în sinteza trigliceridelor din lapte.

Producția cantitativă de lapte este influențată major de GH care acționează asupra glandei mamare prin stimularea în ficat a sintezei de IGF1. Eliberat în sânge IGF1 determină în glanda mamară proliferarea țesutului epitelial mamar secretor. Un alt mecanism prin care este influențată producția cantitativă de lapte este sinteza de lactoză. Cantitatea de lactoză sintetizată este direct corelată cu activitatea enzimei lactoz-sintetază. Lactoza este principalul carbohidrat din laptele tuturor mamiferelor și este un dizaharid compus din galactoză și glucoză legate covalent prin legaturi ß1,4 glicozidice (Shaper și colab., 1998; Ramakrishnan și colab., 2002). Reacția de sinteza a lactozei, catalizată de lactoz-sintetază, are loc în apartul Golgi fiind ireversibilă. Lactoza odată sintetizată nu poate difuza prin membrana veziculelor secretoare Golgi care se formează și de aceea apa este absorbită și reținută în interiorul lor pentru a echilibra presiunea osmotică (Stinnakre și colab., 1994). Cu cât cantitatea de lactoză sintetizată este mai mare cu atât apa absorbită din citoplasmă în veziculele secretoare este mai mare, ceea ce are ca efect creșterea cantității de lapte (Carsai și colab., 2010a).

## 1.3. Polimorfisme identificate în structura acestor gene și asocierea lor cu cantitatea și calitatea laptelui la taurine

Polimorfismele (mutațiile) din structura acestor gene cheie pot avea efect pozitiv sau negativ asupra dezvoltării glandei mamare, capacității ei lactogene și implicit asupra producției cantitative și calitative de lapte. Efectele unor polimorfisme identificate la o parte din acești loci asupra cantității și calității laptelui au fost evaluate în mai multe studii realizate pe diverse rase de taurine.

**La locusul genei PIT1** au fost identificate mai multe polimorfisme, dintre care un polimorfism de interes de tip A/G a fost identificat în exonul 6 (Woollard și colab., 1994). Studii realizate la rasa Holstein au evidențiat că alela A, caracterizată prin absența situsului pentru enzima *Hinf*1, este asociată cu creșterea cantității de lapte și proteină dar și cu un procent mai mic de grăsime (Renaville și colab., 1997; Zwierzchowski și colab., 2002; Mattos și colab., 2004). Din contră în alte studii nu s-au stabilit asocieri între genotipurile de la acest locus și producția de lapte (Dybus și colab., 2004; Zakizadeh și colab., 2007). Oshima și colab. (2003) au studiat efectul cumulat a doi markeri (PIT1 și alfa S1-cazeina) asupra producției de lapte pe o populație de Holstein American. Genotipurile AA de la locusul PIT1 și BC de la locusul alfa S1-cazeinei au avut influențe semnificative pozitive asupra cantității și calității laptelui. Huang și colab. (2008) au identificat la rasa Holstein American un polimorfism de tip C577A în exonul 3, care determină substituția în proteină a prolinei din poziția 76 cu o histidină. Această nouă alelă a fost asociată cu o creștere semnificativă a cantității de lapte la rasa Holstein.

**La locusul genei PRL** au fost identificate câteva polimorfisme, dintre care o substituție de tip A/G din exonul 4 duce la apariția unui situs de restricție pentru enzima *Rsa*I (Lewin și colab., 1992; Mitra și colab., 1995). Dybus și colab. (2005) au studiat la rasa Friză Poloneză asocierile dintre acest

polimorfism și producția de lapte, genotipul AA fiind asociat cu un procent mai mare de proteină. Brym și colab. (2005a) au studiat asocierile dintre un polimorfism de tip A8398G din exonului 4 și producția de lapte la rasele Holstein Polonez și Jersey. Genotipul AG a fost asociat cu o cantitate mai mare de lapte în timp ce genotipul GG a fost asociat cu un procent mai mare de proteină în lapte. Miceikiene și colab. (2006) au studiat polimorfismul genei prolactinei la patru rase de taurine din Lituania. Genotipul AA a fost asociat cu un procent mai mare de grăsime în lapte în comparație cu genotipurile AB și BB. Ghasemi și colab. (2009) au studiat același polimorfism de tip *Rsa*I din exonul 4 la rasa Montbeliard, genotipul AA fiind asociat cu o cantitate mai mare de lapte. Cu toate acestea rezultatele obținute în alte studii au fost contradictorii (Chung și colab., 1996; Chrenek și colab., 1999; Dybus, 2002).

**La locusul genei GH** au fost identificate câteva polimorfisme intronice asociate semnificativ cu producția de lapte (Hoj și colab., 1993). În exonul 5 a fost identificat un polimorfism de tip G/C localizat în situsul de restricție al enzimei *Alu*I și care determină substituția unei leucine (L) cu o valină (V) în poziția 127 a proteinei mature (Lucy și colab., 1991; Lucy și colab., 1993; Zhang și colab., 1993). Dybus (2002) a studiat la rasa Friză Poloneză asocierile dintre acest polimorfism din exonul 5 și producția de lapte. Genotipul LL a fost asociat cu o cantitate mai mare de grăsime și proteină. Yardibi și colab. (2009) au studiat același polimorfism la rasele de taurine South Anatolian și East Anatolian Red. La ambele rase genotipul LL a fost asociat cu o cantitate mai mare de lapte și procent mai mare de grăsime în comparație cu celelalte două genotipuri. Din contră în alte studii genotipul VV a fost asociat cu o cantitate mai mare de lapte și o compoziție mai buna (Sabour și colab., 1997; Zwierzchowski și colab., 2002)

**La locusul genei IGF1**, Siadkowska și colab. (2006) au studiat la rasa Holstein Polonez asocierile dintre un polimorfism de tip C472T localizat în

regiunea 5'netradusă a genei și producția de lapte. Genotipul CT a fost asociat semnificativ cu o cantitate și un procent mai mare de grăsime și proteină în lapte în comparație cu genotipul CC. Mehmannavaz și colab. (2010) au studiat efectul aceluiași polimorfism la rasa Holstein Iranian. Și în acest studiu genotipul CT a fost asociat cu o cantitate mai mare de lapte și grăsime în comparație cu celelalte genotipuri.

**La locusul genei PRLR**, Brym și colab. (2005b) au studiat la rasele Holstein Polonez și Jersey asocierile dintre un polimorfism de tip A205C din intronului 9 și producția de lapte. Genotipul CC a fost asociat cu o cantitate mai mare de lapte și un procent mai mare de proteină în comparație cu genotipurile AA și AC. Viitala și colab. (2006) au studiat un polimorfism care determină substituția unei serine (S) cu o asparagină (N) în poziția 18 a receptorului pentru prolactină la rasa Finnish Ayrshire, acest polimorfism fiind asociat cu o cantitate mai mare de grăsime și proteină în lapte.

**La locusul genei GHR** existența unor polimorfisme cu efect marcant asupra producției de lapte a fost sugerată în diverse studii (Georges și colab., 1995; Arranz și colab., 1998). În mod particular un polimorfism de tip T/A din exonul 8, care are ca rezultat substituția unei fenilalanine (Phe) cu o tirozină (Tyr) în poziția 279 a proteinei mature, a fost asociat semnificativ cu acest caracter. La rasele Holstein Friză și Jersey acest polimorfism a fost asociat semnificativ cu un procent mai mare de proteină și grăsime și într-o mai mică masură cu o cantitate mai mare de lapte (Blott și colab., 2003). Viitala și colab. (2006), respectiv Sun și colab. (2009), au studiat acest polimorfism la rasele Finnish Ayrshire, respectiv Holstein din China. La rasa Finnish Ayrshire prezența Tyr (alela A) a fost asociată cu un procent mai mare de proteină și grăsime (Viitala și colab., 2006), iar la Holstein cu un procent mai mare de proteină (Sun și colab., 2009).

**La locusul genei STAT5A**, Brym și colab. (2004) au studiat la rasa Jersey un polimorfism de tip G9501A din intronul 9. Genotipul GG a fost asociat cu o cantitate mai mare de lapte și un procent mai mare de grăsime, în timp ce genotipurile AA și AG au fost asociate cu un procent mai mare de proteină. Flisikowski și colab. (2004) au studiat la rasa Friză Poloneză un polimorfism de tip T12743C din exonului 16. Genotipul TC a fost asociat cu o cantitate mai mare de lapte și un procent mai mare de substanță uscată, proteină și lactoză în lapte în comparație cu genotipul TT. Sadeghi și colab. (2008) au studiat același polimorfism la rasa Holstein Italian, genotipul CT fiind asociat cu o cantitate mai mare de proteină în lapte. Selvaggi și colab. (2009) au studiat la rasa Brună Italiană un polimorfism tip C6853T din exonului 7, genotipul CC fiind asociat cu o cantitate mai mare de lapte și un procent mai mare de proteină în comparație cu genotipurile CT și TT.

**La locusul genei DGAT1** a fost identificat un polimorfism de tip AA/GC în exonul 8 care are ca efect substituția unei lizine (K) cu o alanină (A) în proteina matură (Winter și colab., 2002; Kuhn și colab., 2003). Efectul acestui polimorfism asupra producției de lapte a fost studiat pe populații de taurine din Noua Zeelenda (Spelman și colab., 2002), Israel (Weler și colab., 2003), Olanda (Grisard și colab., 2002; Grisard și colab., 2004), Germania (Sanders și colab., 2006), Polonia (Pareek și colab., 2005) și Franța (Gautier și colab., 2007; Näslund și colab., 2008). S-a constatat că efectele acestei substituții de aminoacizi constau în creșterea cantității și a procentului de grăsime din lapte. În urma unui studiu de expresie a fost evidențiat fapul că varianta care conține lizină are o activitate enzimatică mai mare decât cea care conține alanină (Grisard și colab., 2004).

# CAPITOLUL 2

# Metodologia de lucru folosită pentru evidențierea polimorfismelor genetice ale celor 10 gene cheie implicate dezvoltarea și capacitatea lactogenă a glandei mamare la indivizi din rasele Balțată cu Negru Românească (Holstein Friză) și Sura de Stepă, varietatea Moldovenească

## 2.1. Identificarea fermelor de taurine și nominalizarea indivizilor pentru studiu din rasele de taurine Balțată cu Negru Românească și Sura de Stepă

În vederea alegerii indivizilor pentru studiu din rasele Balțată cu Negru Românească (Holstein Friză) și Sura de Stepă, varietatea Moldovenească, au fost realizate deplasări în mai multe ferme de taurine. În cadrul acestor vizite au fost consultate fișele de urmărire ale taurinelor în care sunt înregistrate lactațiile fiecarui individ.

Un prim criteriu de nominalizare a indivizilor de interes pentru studiu din cele două rase de taurine a fost producția cantitativa și calitativa de lapte. Al doilea criteriu a fost gradul de dezvoltare al glandei mamare care ne-a furnizat informații fenotipice valoroase despre capacitatea lactogenă a acesteia, indicând diferențe de natură genetică între indivizii cu producție mare și mica de lapte, aspecte investigate în cadrul proiectului.

Prin aplicarea acestor două criterii au fost nominalizați pentru studiul de secvențiere a celor 10 gene un număr de 24 indivizi din ferme din județele Cluj, Alba și Iași. Aceștia au fost organizați în trei loturi experimentale și anume:

- **două loturi de indivizi din rasa Balțată cu Negru Românească** (Figura 1), unul alcătuit din 8 indivizi cu o glandă mamară bine dezvoltată și cu o producție foarte mare de lapte de peste 10000l/lactație (lotul BNR-M), iar celălalt alcătuit din 8 indivizii cu o glandă mamară mai slab dezvoltată și cu o producție mai mică de lapte de sub 6000l/lactație (lotul BNR-S).

**1) Lotul BNR-M**

**2) Lotul BNR-S**

**Fig. 1.** Exemplare de taurine luate în studiu din rasa Balțată cu Negru Românească care se diferențiază în ceea ce privește producția de lapte, gradul de dezvoltare al glandei mamare și capacitatea ei lactogenă

➢ **un lot de alcătuit din 8 indivizi din rasa Sura de Stepă, varietatea Moldovenească (lotul SS)**, 4 din nucleul de la SCDCB Dancu, Județul Iași și 4 din nucleul de la USAMV Cluj-Napoca, Județul Cluj. Indivizii din această rasă ancestrală se caracterizează printr-o glandă mamară foarte slab dezvoltată și o producție foarte mica de lapte de 1000-1500l/lactație (Figura 2).

**3) Lotul SS**

**Fig. 2.** Exemplare de taurine luate în studiu din rasa Sura de Stepă, varietatea Moldovenească la care evidențiază o dezvoltare slabă a glandei mamare indicând o capacitate lactogenă scazută

Pentru studiul de genotipizare au fost nominalizați suplimentar un număr de 156 indivizi din cele trei categorii, câte 52 pe fiecare lot (BNR-M, BNR-S, respectiv SS).

## 2.2. Amplificarea regiunilor codificatoare din structura genelor care codifică PIT1, GH și PRL la indivizi din rasele Balțată cu Negru Românească și Sura de Stepă

### 1. Recoltarea probelor de sânge și extracția ADN

Recoltarea probelor de sânge (2 ml/individ) pentru extracția ADN-ului a fost realizată de la cei 24 de indivizi nominalizați: 16 din rasa Balțată cu Negru Românească (8 cu producție mare de lapte și 8 cu producție mai mica de lapte) și 8 din rasa Sura de Stepă, rasă primitivă cu producție mica de lapte. Probele au fost recoltate steril din vena jugulară sau caudală în vacutainere cu anticoagulant $K_3$-EDTA și apoi au fost stocate la 4°C. Recoltarea a fost realizată de către un medic veterinar (Figura 3).

**Fig. 3.** Recoltarea probelor de sânge de la taurinele luate în studiu din rasele Balțată cu Negru Românească, respectiv Sura de Stepă

Extracția ADN din leucocitele sângelui integral a fost realizată folosind un protocol descris anterior (Balteanu și colab., 2013), cu mici modificari. Pentru aceasta 100 µl de sânge integral din fiecare probă au fost transferați în câte un tub Eppendorf de 1,5 ml steril. Peste fiecare probă au fost adăugați 600 µl

de soluție PBS sterilă (0,5 M; pH=7,4), iar după o vortexare scurtă tuburile au fost centrifugate la 14.000 g timp de 20 de secunde. Supernatantul fost înlăturat de fiecare dată și spălarea a fost repetată de două ori. După spălarea finală și înlăturarea supernatantului pelletul conținând elemente figurate albe a fost supus unei lize alcaline prin adăugarea a 50 µl de soluție de NaOH 200 mM. După o centrifugare scurtă tuburile au fost incubate 15 minute la $95^0$C pe un termomixer.

Neutralizarea probelor a fost realizată prin adăugarea unei proporții de egale (50 µl) de soluție de neutralizare conținând 200 mM HCl + 100 mM Tris HCl (pH=8,5). După o centrifugare și o vortexare scurtă cantitatea, puritatea și concentrația de ADN din probe a fost cuantificată cu ajutorul spectrofotometrului Nanodrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA), iar integritatea prin migrare în gel de agaroză. Probele au fost diluate până la o concentrație finală de 150 ng/µl și apoi au fost stocate la $4^0$C în vederea analizei genetice a locilor de interes.

**2. Designul perechilor de primeri necesari și amplificarea exonilor din genele PIT1, GH și PRL de la cele două rase de taurine**

Designul perechilor de primeri necesari amplificării regiunilor exonice codificatoare ale genelor PIT1, GH și PRL a fost realizat folosind secvențele de referință disponibile în GenBank (http://www.ncbi.nlm. nih.gov/genbank/).

Primerii au fost proiectați din regiunile intronice flancatoare ale exonilor, folosind programul de design de primeri Primer 3 (http://frodo.wi.mit. edu/ primer3/). În designul și alegerea perechilor de primeri necesari amplificării regiunilor codificatoare din genele de interes s-au avut în vederea următoarele aspecte și anume:

- să flancheze regiunile exonice de interes în așa fel încât întreaga regiune codificatoare a genelor studiate să poate fi analizată și posibilele polimorfisme să poată fi identificate;
- temperatura lor de aliniere sa fie cât mai aproape de $60^0$C;
- conținutul în guanină și citozină să fie de minim 40%;
- evitarea obținerii de produși nespecifici, dimeri sau harpine.

În urma comparării secvențelor regiunilor de interes din cele trei gene au fost aleși pentru amplificarea și secvențierea regiunilor codificatoare (exonilor) ale acestor gene mai multe seturi de primeri după cum urmează: 6 seturi pentru gena PIT1, 3 seturi pentru gena GH și 5 seturi pentru gena PRL. Marimea produșilor de amplificare a fost estimată între 400 și 1100 perechi de baze (pb) în funcție de regiunea amplificată.

Amplificarea a fost realizată folosind kitul 2X Tissue Green Master (Fermentas, Vilnius, Lituania), 100 ng de ADN genomic extras de la indivizii din cele două rase de taurine luate în studiu, 10 picomoli din fiecare primer (forward, respectiv revers) și următoarele condiții de amplificare: 1 ciclu la 94°C/3 minute, urmat de 35 de cicluri la 94°C/30 de secunde, 58°C-60°C /30 de secunde, 72°C/0,5-1 minut (în funcție de mărimea estimată a produșilor de amplificare) și un ciclu de extensie finală la 72°C/3 minute.

Produșii de amplificare au fost analizați prin migrare în gel de agaroză de concentrație 2%, conținând 1X SybrSafe (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Electroforeza a fost realizată în tampon TBE 1X (pH= 8,5) la un voltaj constant de 65 V timp de 2 ore. Imaginea gelului a fost preluată și analizată cu ajutorul sistemului de achiziție a imaginii Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

## 2.3. Amplificarea regiunilor codificatoare din structura genelor care codifică IGF1, PRLR, GHR, STAT5A, DGAT1, GALT și LALBA la indivizi din rasele Balțată cu Negru Românească și Sura de Stepă

### 1. Recoltarea probelor de lapte și extracția ARN din celulele epiteliale secretoare ale glandei mamare

În vederea extracției ARN-ului din celulele epiteliale secretoare ale glandei mamare prezente în lapte, recoltarea probelor de lapte a fost realizată de la cei 24 de indivizi nominalizați din cele două rase. Probele de lapte (50 ml/individ) au fost colectate individual direct din glanda mamară în tuburi sterile și transportate la $4^{\circ}$ C (Figura 4).

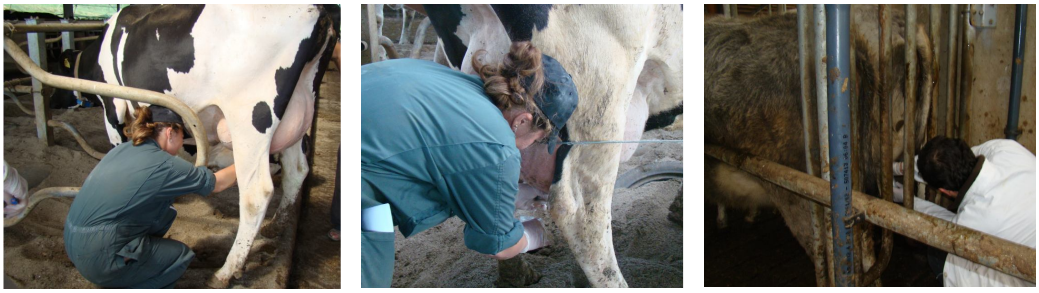


**Fig. 4.** Recoltarea probelor de lapte de la taurinele luate în studiu din rasele Balțată cu Negru Românească, respectiv Sura de Stepă

Pentru recuperarea celulelor somatice din lapte, tuburile conținând probele de lapte recoltate de la fiecare individ au fost centrifugate la 2000 g timp de 15 minute la $4^{0}$C. Grăsimea solidificată la suprafață a fost înlăturată cu o spatulă sterilă, iar supernatantul de asemenea. Pentru eliminarea cazeinei şi grăsimii reziduale pelletul celular depus la baza tubului a fost spălat de două ori cu soluție PBS (0,5 M; pH=7,4).

Celulele somatice recuperate din lapte au fost resuspendate în 1 ml de PureZOL/probă, iar extracția ARN-ului total din probe a fost realizată conform protocolului pus la dipoziție de către producător (BioRad Laboratories,

Hercules, CA, USA). Pentru solubilizarea completă a componentelor celulare probele au fost incubate timp de 20 minute la temperatura camerei. După solubilizare în fiecare probă au fost adaugați câte 0,2 ml de cloroform cu scopul de a separa cele trei faze conținând cele trei fracțiuni (ADN, ARN și proteine). Probele au fost agitate timp de 15 secunde și incubate 5 minute la temperatura camerei, după care au fost centrifugate la 12000 g timp de 15 minute la $4^0$C.

Faza apoasă incoloră separată la suprafața tubului, conținând ARN total (ARN ribozomal - ARNr, ARN de transport - ARNt și ARN mesager - ARNm), a fost apoi transferată în tuburi Eppendorf sterile de 1,5 ml.

Pentru precipitarea ARN-ului peste faza apoasă au fost adaugați 0,5 ml de izopropanol, iar după o incubare timp de 10 minute la temperatura camerei probele au fost centrifugate la 12.000 g timp de 10 minute. După înlăturarea supernatantului ARN-ul precipitat sub forma unui gel la baza tubului a fost spălat cu 1 ml de etanol 70%. După o vortexare și centrifugare la 7000 g timp de 5 minute la $4^0$C supernatantul a fost înlăturat, iar pelletul a fost uscat pentru înlăturarea alcoolului rezidual.

ARN-ul total recuperat a fost redizolvat în apă MiliQ sterilă. După o centrifugare și o vortexare scurtă cantitatea, puritatea și concentrația de ARN total extras a fost cuantificată cu ajutorul spectrofotometrului Nanodrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA), iar integritatea prin migrare în gel de agaroză.

## 2. Obținerea ADN-urilor complementare monocatenare (cADN) prin reverstranscripția probelor de ARN purificate

Pentru obținerea primei catene a cADN-urilor corespunzătoare regiunilor codificatoare ale genelor IGF1, PRLR, GHR, STAT5A, DGAT1, GALT și LALBA care se exprimă în celulele epiteliale secretoare ale glandei mamare, a fost folosit kitul iScript$^{TM}$ Select cDNA Synthesis Kit (BioRad Laboratories,

Hercules, CA, USA). În vederea obținerii primei catene din cADN-urile de interes setarea reacțiilor de revestranscripție a fost realizată folosind în fiecare reacție 1 µg de ARN total și o combinație de 1:1 de primeri oligo-dT și primeri degenerați. Reverstranscripția a fost realizată conform următorului protocol: 1 ciclu la 25°C/5 minute, 1 ciclu la 42°C/60 minute și 1 ciclu la 70°C/5 minute.

**3. Designul perechilor de primeri necesari și obținerea prin amplificare a cADN-urilor dublucatenare corespunzătoare acestor gene**

În designul și alegerea perechilor de primeri necesari amplificării specifice a cADN-urilor monocatenare și obținerii cADN-urilor dublucatenare din genele de interes s-au avut în vedere criteriile de bază descrise anterior.

Variabilitatea mărimii transcripților specifici acestor șapte gene exprimate în celulele epiteliale secretoare ale glandei mamare în lactație a impus designul mai multor seturi de primeri. Astfel pentru obținerea cADN-urilor dublucatenare de interes au fost proiectate și testate 34 de seturi de primeri, folosind ca matriță secvențe de referință ale acestor transcripți disponibile în GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) și programul de design de primeri Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/).

Amplificarea PCR a fost realizată folosind kitul iQ SYBR Green Supermix (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), 1 µl din reacția de reverstranscripție, 10 picomoli din fiecare primer și următoarele condiții de amplificare: 1 ciclu la 94°C/3 minute, urmat de 35 de cicluri la 94°C/1 minut, 58°C-60°C/1 minut, 72°C/60 1-1,5 minute (în funcție de mărimea estimată a produșilor de amplificare) și un ciclu de extensie finală la 72°C/7 minute. Amplificarea a fost realizată folosind thermal-cyclerul iQ5 Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

cADN-urile obținute au fost analizate prin migrare în gel de agaroză de concentrație 2%, conținând 1X SybrSafe (Invitrogen, Eugene, OR, USA).

Electroforeza a fost realizată în tampon TBE 1X (pH= 8,5) la un voltaj constant de 65 V timp de 2 ore. Gelul a fost analizat cu ajutorul sistemului de achiziție a imaginii Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### 2.4. Secvențierea produșilor de amplificare obținuți din regiunile codificatoare ale celor 10 gene luate în studiu, analiza și interpretarea cromatogramelor de secvențiere

Pentru realizarea secvențierii regiunilor exonice și a cADN-urilor obținute prin amplificarea zonelor de interes din cele 10 gene luate în studiu, purificarea produșilor de amplificare obținuți în fiecare reacție a fost realizată folosind kitul ZR-DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research Corporation, Orange, CA, USA), conform protocolul recomandat de către producător. Astfel la 20 µl de produs PCR au fost adăugați în fiecare probe câte 100 µl de soluție tampon de legare a ADN-ului amplificat (DNA binding buffer), iar după o vortexare scurtă probele au fost transferate în coloanele de purificare. Coloanele au fost centrifugate la 12.000 g timp de 30 de secunde, iar lichidul adunat în tubul de colectare a fost înlăturat. Produșii de amplificare reținuți în coloana de purificare au fost spălați de două ori cu tampon de spălare (DNA wash buffer), iar după o centrifugare la 12.000 g timp de 30 de secunde și înlăturarea lichidului adunat în tubul de colectare coloanele au fost uscate pentru înlăturarea alcoolului rezidual. Pentru eluarea produșilor de amplificare în centrul filtrului fiecărei coloane au fost adăugați câte 10 µl de apa miliQ sterilă, iar după o incubare timp de 1 minut acestea au fost centrifugate la 15.000 g timp de 30 de secunde.

Puritatea produșilor PCR obținuți a fost evaluată cu ajutorul spectrofotometrul Nanodrop ND 1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA).

Amplificarea de secvențiere a fost realizată folosind metoda dideoxynucleotide sequencing chain termination și kitul BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Fiecare catenă a fost secvențiată cu primerii corespunzători (forward, respectiv revers) utilizați și la obținerea produșilor PCR. Produșii de secvențiere au fost analizați prin electroforeză de capilaritate cu ajutorul secvențiatorului Applied Biosystem 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Analiza cromatogramelor de secvențiere a fost realizată cu ajutorul programului BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html). Secvențele rezultate în urma interpretării cromatogramelor de secvențiere au fost supuse unei analize Blast în vederea stabilirii identității lor, fiind comparate în același timp cu secvențele existente în baza de date GenBank (http://blast. ncbi. nlm. nih.gov/Blast.cgi).

În vederea identificării mutațiilor care caracterizează cei 10 loci studiați și stabilirii polimorfismelor genetice care ar putea explica diferențele privind capacitatea lactogenă a glandei mamare la trei loturi de taurine studiate din cele două rase, secvențele genelor omoloage au fost aliniate comparativ.

Mutațiile evidențiate (unele descrise deja în literatură, altele noi) au fost folosite pentru realizarea testării genetice a mai multor indivizi din cele două rase de taurine, în vederea stabilirii frecvenței alelelor și genotipurilor la cei 10 loci studiați.

## 2.5. Genotipizarea prin PCR-RFLP la cei 10 loci a celor două rase de taurine și stabilirea structurii genetice în populațiile analizate

Pentru stabilirea mai precisă a structurii genetice la locii studiați (calcularea frecvențelor alelelor și genotipurilor) a fost realizată o genotipizare la cele două rase de taurine, folosind probele de ADN extrase din cele 156 de probe de sânge

recoltate suplimentar de la cele trei loturi de indivizi. Protocoalele de recoltare a probelor de sânge și respectiv de extracție ale ADN-ului folosite au fost descrise la punctul 2.2.

Pentru genotipizare la locii studiați a indivizilor din cele două rase de taurine au fost folosite seturi de primeri specifici (unii descriși în literatură, alții nou proiectați). Amplificarea și analiza regiunilor în care au fost evidențiate mutații în genele studiate a fost realizată prin tehnica PCR-RFLP. Această metodă de genotipizare implică digestia produșilor obținuți prin amplificarea PCR a zonelor polimorfe din genele de interes și digestia lor cu enzime de restricție specifice. Astfel pentru fiecare din produșii de amplificare prezumtivi a fi obținuți din zonele polimorfe au fost întocmite pe baza mutațiilor evidențiate hărți de restricție teoretice cu ajutorul programului NEBcutter V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/). În urma analizei profilelor de restricție teoretice au fost stabilite enzimele de restricție utilizabile și profilele de digestie preconizate a fi obținute, utile pentru identificarea corectă genotipurilor. Acest lucru a permis genotipizarea tuturor indivizilor luați în studiu.

În vederea genotipizării, reacțiile de amplificare a zonelor țintă din genele de interes au fost realizate folosind kitul MyTaq Red Mix, 2x (Bioline Reagents Ltd., London, UK), 100 ng de ADN genomic (extras de la indivizii din cele două rase de taurine luate în studiu), 10 picomoli din fiecare primer specifici regiunii țintă (forward, respectiv revers) și următoarele condiții de amplificare: 1 ciclu la 94°C/3 minute, urmat de 35 de cicluri la 94°C/45 de secunde, 58°C-60°C/45 de secunde, 72°C/45 de secunde și un ciclu de extensie finala la 72°C/3 minute.

Pentru **genotipizare la locusul PIT1 (POU1F1)** a fost amplificat un produs de 451pb conținând întreaga regiune codificatoare a exonului 6, regiune în care este localizată o substituție de tip adenină-guanină (A/G) care caracterizează două alele de la acest locus, A respectiv B.

Amplificarea a fost realizată cu ajutorul unui set de primeri raportați anterior (Woollard și colab., 1994) localizați pe intronul 5 (primerul forward), respectiv pe exonul 6 în regiunea 3' netradusă a genei (primerul revers). Pentru evidențierea celor două alele restricția produșilor de amplificare de 451pb a fost realizată pe o cantitate de 12 µl de produs PCR, peste care au fost adăugați 20,2 µl de amestec de digestie/probă conținând 1,2 µl de enzimă *Hinf*I fast digest, 2 µl de soluție tampon fast digest și 17 µl apă miliQ sterilă (Fermentas, Vilnius, Lituania). Probele au fost incubate la 37°C timp de 30 de minute.

Pentru **genotipizare la locusul GH** a fost amplificat un produs de 223pb conținând o parte din exonul 5, unde este localizată o substituție de tip guanină-citozină (G/C) care determină substituția a unei leucine (L) cu o valină (V) în poziția 127 a proteinei mature.

Amplificarea a fost realizată cu ajutorul unui set de primeri raportați anterior (Mitra și colab., 1995) localizați pe intronul 4 (primerul forward), respectiv pe exonul 5 (primerului revers). Pentru evidențierea celor două alele restricția produșilor de amplificare de 223pb a fost realizată pe o cantitate de 12 µl de produs PCR folosind enzima *Alu*I în format fast digest (Fermentas, Vilnius, Lituania). Probele au fost incubate la 37°C timp de 30 de minute.

Pentru **genotipizare la locusul PRL** a fost amplificat un produs de 156pb conținând o parte din exonul 4, unde este localizată o substituție de tip adenină-guanină (A/G) care caracterizează două alele A, respectiv B de la acest locus.

Amplificarea a fost realizată cu ajutorul unui set de primeri raportați anterior (Mitra și colab., 1995), ambii localizați pe exonul 4. Pentru evidențierea celor două alele restricția produșilor de amplificare de 156pb a fost realizată pe o cantitate de 12 µl de produs PCR folosind enzima *Rsa*I în format fast digest (Fermentas, Vilnius, Lituania). Probele au fost incubate la 37°C timp de 30 de minute.

Pentru **genotipizare la locusul IGF1** a fost amplificat un produs de 249pb din regiunea promotorului genei, unde este localizată o substituție de tip citozină-timină(C/T) care caracterizează două alele C, respectiv T de la acest locus. Această regiune este deosebit de importantă pentru expresia genei.

Amplificarea a fost realizată cu ajutorul unui set de primeri raportați anterior (Ge și colab., 2001), ambii localizați în regiunea promotorului genei. Pentru evidențierea celor două alele restricția produșilor de amplificare de 249pb a fost realizată pe o cantitate de 12 µl de produs PCR folosind enzima *Sna*BI în format fast digest (Fermentas, Vilnius, Lituania). Probele au fost incubate la 37°C timp de 30 de minute.

Pentru **genotipizare la locusul PRLR** a fost amplificat un produs de 186pb conținând o parte din exonul 3 ce codifică peptida semnal și o parte din intronul 3. În regiunea peptidei semnal este localizată o dublă substituție de tip adenină-citozină/guanină-timină (AC/GT) (Viitala și colab., 2006) care caracterizează două alele de la acest locus AC, respectiv GT.

Amplificarea a fost realizata cu ajutorul unui set de primeri nou proiectați localizați pe exonul 3 în regiunea care codifică peptida semnal (primerul forward), respectiv pe intronul 3 (primerul revers). Pentru evidențierea celor două alele restricția produșilor de amplificare de 186pb a fost realizată pe o cantitate de 12 µl de produs PCR, peste care au fost adaugați 20 µl de amestec de digestie/probă conținând 1 µl de enzimă *Bse*MII fast digest, 2 µl de soluție tampon fast digest și 15,5 µl apă miliQ sterilă și 1,5 µl S-adenosylmethionine (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Probele au fost incubate la 55°C timp de 30 de minute.

Pentru **genotipizare la locusul GHR** a fost amplificat un produs de 175pb conținând o parte din exonul 8 și o parte din intronul 8, unde este localizată o substituție de tip timină/adenină (T/A) care caracterizează două alele de la acest

locus A, respectiv T. Harta de restricție a produsului amplificat nu a evidențiat enzime de restricție care ar putea discrimina între cele două alele.

Amplificarea a fost realizată cu ajutorul unui set de primeri descriși anterior (Sun și colab., 2009). În produsul PCR a fost creat artificial un situs nou de restricție pentru enzima *Ssp*I prin introducerea în primerul forward în poziția 23 a unei adenine (A) fața de secvența de referință, în care în această poziție se află o timina (T). Pentru evidențierea celor două alele restricția produșilor de amplificare de 175pb a fost realizată pe o cantitate de 12 µl de produs PCR, peste care au fost adaugați 21 µl de amestec de digestie/probă conținând 1 µl de enzimă *Ssp*I, 2 µl de soluție tampon și 18µl apă miliQ sterilă (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Probele au fost incubate la 37°C timp de 2 ore.

Pentru **genotipizare la locusul STAT5A** a fost amplificat un produs de 251pb conținând o parte din intronul 15, tot exonul 16 și o parte din intronul 16, unde este localizată o substituție de tip timină/citozină (T/C) care caracterizează două alele de la acest locus T, respectiv C.

Amplificarea a fost realizată cu ajutorul unui set de primeri raportați anterior (Flisikowski și colab., 2004) localizați pe intronul 15 (primerul forward), respectiv pe intronul 16 (primerul revers). Pentru evidențierea celor două alele restricția produșilor de amplificare de 251pb a fost realizată pe o cantitate de 12 µl de produs PCR folosind enzima *Rse*I în format fast digest (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Probele au fost incubate la 37°C timp de 2 ore.

Pentru **genotipizare la locusul DGAT1** a fost amplificat un produs de 179pb conținând o parte din intronul 7, tot exonul 8 și intronul 8 și o parte din exonul 9, unde este localizată o dublă substituție de tip guanină-citozină/ adenină-adenină (GC/AA) care caracterizează două alele de la acest locus (Winter și colab., 2002; Kuhn și colab., 2003).

Amplificarea a fost realizată cu ajutorul unui set de primeri nou proiectați localizați parțial pe intronul 7 și exonul 8 (primerul forward), respectiv pe exonul 9 (primerul revers). Pentru evidențierea celor două alele restricția produșilor de amplificare de 179pb a fost realizată pe o cantitate de 12 µl de produs PCR folosind enzima *Tau*I în format fast digest (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Probele au fost incubate la 55°C timp de 30 de minute.

Pentru **genotipizare la locusul GALT** a fost amplificat un produs de 301pb conținând o parte din intronul 1, tot exonul 2 și o parte din intronul 2, unde este localizată o substituție de tip citozină/timină (C/T) care caracterizează două alele de la acest locus T, respectiv C.

Amplificarea a fost realizata cu ajutorul unui set de primeri nou proiectați localizați pe intronul 1 (primerul forward), respectiv pe intronul 2 (primerul revers). Pentru evidențierea celor două alele restricția produșilor de amplificare de 301pb a fost realizată pe o cantitate de 12 µl de produs PCR folosind enzima *Nco*I în format fast digest (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Probele au fost incubate la 37°C timp de 30 de minute.

**La locusul LALBA** nu au fost evidențiate prin secvențiere mutații la cele două rase de taurine care să justifice genotipizarea prin PCR-RFLP, acest locus fiind monomorf.

Analiza produșilor de restricție a fost realizată prin migrare în gel de agaroză de concentrație cuprinsă între 2,5-3,5% în funcție de mărime produșilor și conținând 1X SybrSafe (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Electroforeza a fost realizată în tampon TBE 1X (pH= 8,5) la un voltaj constant de 65 V timp de 2-3 ore până la separarea completă a fragmentelor rezultate din digestia enzimatică. Imaginea gelului a fost preluată și analizată cu ajutorul sistemului de achiziție a imaginii Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Genotipurile de la locii studiați au fost stabilite pe baza profilelor de restricție obținute în urma separării electroforetice. Genotipurile observate la cele trei loturi de taurine din cele două rase au fost centralizate, iar pe baza lor au fost calculate frecvențele alelelor și genotipurilor la locii studiați în populațiile analizate.

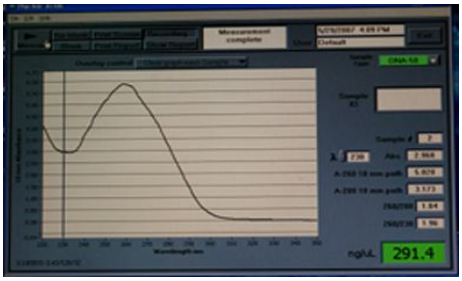
# CAPITOLUL 3

# Rezultate privind polimorfismele genetice evidențiate în cele 10 gene studiate la indivizii din rasele Balțată cu Negru Românească și Sura de Stepă

## 3.1. Rezultate privind cuantificarea probelor de ADN și ARN extrase din probele biologice recoltate

Cuantificarea probelor de ADN total și ARN total extrase a fost realizată cu ajutorul spectrofotometrul Nanodrop ND 1000 prin măsurarea absorbanței la 260 nm și 280 nm. Raportul 260/280 nm ne indică o puritate optimă a probei de ADN care trebuie sa fie cuprinsă în intervalul 1,7-1,8 în cazul ADN-ului și în intervalul 1,8-2 în cazul ARN-ului.

**Determinarea parametrilor ADN-ului total** extras din probele de sânge integral recoltate a evidențiat valori ale concentrației cuprinse între 112,37-126,82 ng/µl și o puritate cuprinsă între 1,79-1,87 (Figura 5).




| | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | **Sample ID** | **ng/ul** | **A260** | **A280** | **260/280** |
| 2 | Proba 1 - BNR-M | 124.88 | 0.498 | 0.278 | 1.79 |
| 3 | Proba 2 - BNR-M | 119.97 | 0.399 | 0.218 | 1.83 |
| 4 | Proba 3 - BNR-M | 126.82 | 0.536 | 0.288 | 1.87 |
| 5 | Proba 1 - BNR-S | 112.37 | 0.247 | 0.133 | 1.86 |
| 6 | Proba 2 - BNR-S | 114.57 | 0.291 | 0.159 | 1.83 |
| 7 | Proba 3 - BNR-S | 113.45 | 0.269 | 0.148 | 1.82 |
| 8 | Proba 1 - SS | 120.98 | 0.42 | 0.234 | 1.79 |
| 9 | Proba 2 - SS | 117.85 | 0.357 | 0.192 | 1.86 |
| 10 | Proba 3 - SS | 115.61 | 0.312 | 0.172 | 1.81 |

**Fig. 5.** Date privind parametrii ADN-ului total extras din o parte din probele de sânge recoltate de la cei 24 de indivizi, determinați cu ajutorul spectrofotometrului Nanodrop ND 1000

Integritatea ADN-ului total a fost evaluată prin migrare în gel de agaroză de concentrație 1,5%. În urma analizării profilelor electroforetice s-a constatat prezența unei benzi majore în apropierea godeurilor de încărcare caracteristice

fragmentelor de ADN de dimensiuni mari, dar și a unui smear de-a lungul godeurilor caracteristic migrării fragmentelor de ADN parțial degradat sau denaturat (monocatenar) sau a fragmentelor de ADN de dimensiuni mai mici (Figura 6).

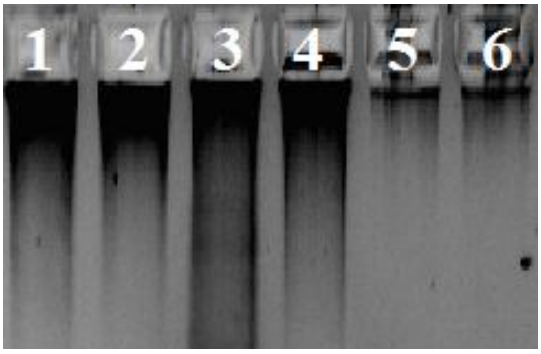



**Fig. 6.** Evaluarea integrității ADN-ului total extras din o parte din probele de sânge recoltate de la cei 24 de indivizi, prin migrare în gel de agaroză. Probele 1-4: ADN parțial denaturat; Probele 5-6: ADN nedenaturat integru

Acest profil de migrare este normal a fi obținut, deoarece metoda de extracție a ADN-ului folosită a implicat încălzirea probelor la $95^0$ C ceea ce a dus la denaturarea ADN-ului dublucatenar.

Analizând rezultatele obținute prin cele două metode de cuantificare am concluzionat că probele de ADN extrase s-au încadrat în parametrii normali, fiind utilizabile pentru analizele genetice planificate (secvențierea exonilor din cele trei gene studiate care nu se exprimă în glanda mamară, respectiv pentru studiul de genotipizare).

**Determinarea parametrilor ARN-ului total** extras din celulele epiteliale secretoare ale glandei mamare recuperate din probele de lapte recoltate de la cei 24 de indivizi, a evidențiat valori ale concentrației cuprinse între 750,31-991,32 ng/µl și o puritate cuprinsă între 1,84-2,01 (Figura 7).

| | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | **Sample ID** | **ng/ul** | **A260** | **A280** | **260/280** |
| 2 | Proba 1 - BNR-M | 857.46 | 15.477 | 8.18 | 1.89 |
| 3 | Proba 2 - BNR-M | 873.66 | 17.491 | 9.227 | 1.90 |
| 4 | Proba 3 - BNR-M | 895.57 | 15.163 | 8.131 | 1.86 |
| 5 | Proba 1 - BNR-S | 750.31 | 17.751 | 8.948 | 1.98 |
| 6 | Proba 2 - BNR-S | 981.21 | 26.132 | 14.434 | 1.81 |
| 7 | Proba 3 - BNR-S | 991.32 | 28.421 | 14.98 | 1.90 |
| 8 | Proba 1 - SS | 979.23 | 27.645 | 14.521 | 1.90 |
| 9 | Proba 2 - SS | 981.83 | 25.297 | 12.578 | 2.01 |
| 10 | Proba 3 - SS | 921.05 | 27.521 | 14.981 | 1.84 |

**Fig. 7.** Date privind parametrii ARN-ului total extras din o parte din probele de lapte recoltate de la cei 24 de indivizi, determinați cu ajutorul spectrofotometrului Nanodrop ND 1000

Integritatea ARN-ului total a fost evaluată prin migrare în gel de agaroză de concentrație 2%. În urma analizării profilelor electroforetice s-a constatat prezența a două benzi electroforetice majore bine definite și care indică prezența unui ARNr integru, dar și a unui smear care conține populații de ARNt și ARNm și care sunt rezultatul activității genelor care se exprimă în glanda mamară în lactație (Figura 8).

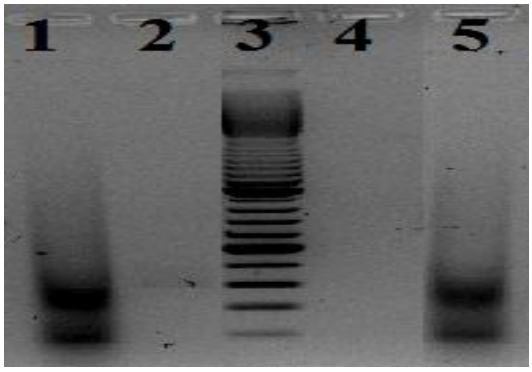



**Fig. 8.** Evaluarea integrității ARN-ului total prin migrare în gel de agaroză. Probele 1,5: ARN total; Proba 2, 4: control negativ; Proba 3: Ladder ADN 100pb plus (Fermentas, Vilnius, Lituania)

Deoarece parametrul principal după care se face evaluarea integrității ARN-lui este prezența și intensitatea fluorescenței celor 2 benzi electroforetice aparținând ARNr, am concluzionat că ARN-ul total extras din probele de lapte recoltate de le cei 24 de indivizi este integru structural.

Analizând rezultatele obținute prin cele două metode de cuantificare am concluzionat că probele de ARN extrase s-au încadrat în parametrii normali, fiind utilizabile pentru analizele genetice planificate (sinteza cADN-urilor de interes pe baza ARNm și secvențierea regiunilor codificatoare ale celor 7 gene luate în studiu care se exprimă în glanda mamară în lactație).

## 3.2. Rezultate privind mutațiile evidențiate prin amplificarea și secvențierea regiunilor exonice codificatoare și a regiunilor intronice flancatoare ale genelor PIT1, GH și PRL

Migrarea în gel de agaroză a produșilor obținuți prin amplificarea din ADN-ul genomic a regiunilor exonice codificatoare și a regiunile intronice flancatoare din genele PIT1, GH și PRL de la taurinele din cele două rase studiate, a evidențiat așa cum era de așteptat fragmente de ADN cuprinse între 400pb și 1100pb în funcție de regiunea amplificată din cele trei gene. O parte din produșii de amplificare obținuți sunt evidențiați în Figura 9.

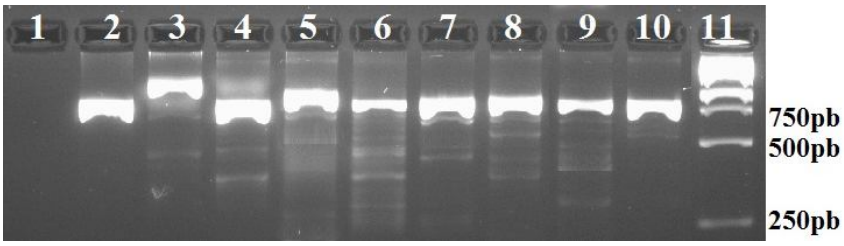



**Fig. 9.** Profil electroforetic evidențiind produși de amplificarea obținuți prin amplificarea regiunilor codificatoare ale genelor PIT1 (câmpurile 8, 9 și 10), GH (câmpurile 5, 6 și 7) și PRL (câmpurile 2, 3 și 4); câmpul 1: control negativ; câmpul 11: Ladder ADN 1kb (Fermentas, Vilnius, Lituania).

Secvențierea produșilor de amplificare obținuți și analiza cromatogramelor de secvențire a evidențiat o serie de mutații care caracterizează alelele prezente la acești loci la indivizii din cele două rase de taurine. Secvențele obținute au fost comparate prin analiza Blast cu secvențele existente în baza de date GenBank, confirmând astfel apartenența lor la genele ținta amplificate și la specie.

La **locusul genei PIT1** au fost evidențiate patru mutații simple și anume: o substituție de tip adenină-citozină (A/C) localizată pe fragmentul amplificat ce conține exonul 2 (Figura 10a), două substituții de tip adenină-citozină (A/C), respectiv de tip adenină-timină (A/T) localizate pe fragmentul amplificat ce conține exonul 4 (Figura 10b, c) și o substituție de tip adenină-guanină (A/G) localizată pe fragmentul amplificat ce conține exonul 6 (Figura 10d; Carsai și colab., 2012).

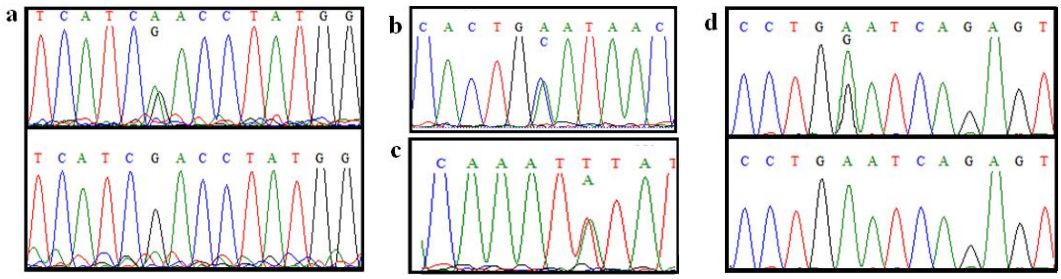



**Fig. 10.** Cromatograme de secvențiere evidențiind mutații din gena PIT1 de la taurinele din cele două rase studiate

La **locusul genei GH** au fost evidențiate două mutații și anume: o substituție de tip guanină-timină (G/T) (Figura 11a) și una de tip citozină-guanină (C/G) (Figura 11b; Carsai și colab., 2011a), ambele fiind localizate pe fragmentul amplificat ce conține exonul 5.

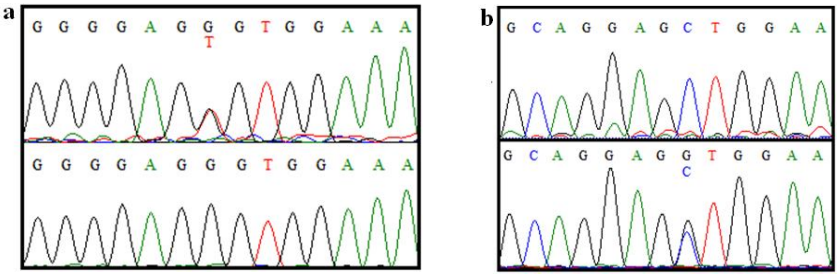



**Fig. 11.** Cromatograme de secvențiere evidențiind mutații în gena GH de la taurinele din cele două rase studiate

La **locusul genei PRL** a fost evidențiată o mutație de tip adenină-guanină (A/G) localizată pe fragmentul amplificat ce conține exonul 4 (Figura 12; Carsai și colab., 2011b).

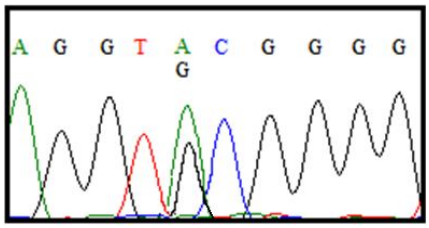



**Fig. 12.** Cromatograme de secvențiere evidențiind o mutație din gena PRL de la taurinele din cele două rase studiate

## 3.3. Rezultate privind mutațiile evidențiate prin amplificarea și secvențierea cADN-urilor conținând regiunile exonice codificatoare obținute din genele IGF1, PRLR, GHR, STAT5A, DGAT1, GALT și LALBA

Migrarea în gel de agaroză a produșilor obținuți prin revestranscripția ARNm și amplificarea PCR cu primeri specifici a regiunile codificatoare ale genelor IGF1, PRLR, GHR, STAT5A, DGAT1, GALT și LALBA de la taurinele din cele două rase studiate, a evidențiat așa cum era de așteptat fragmente de cADN cuprinse între 431pb și 1139 pb în funcție de regiunea

amplificată. O parte din produșii de amplificare obținuți sunt evidențiați în Figura 13.

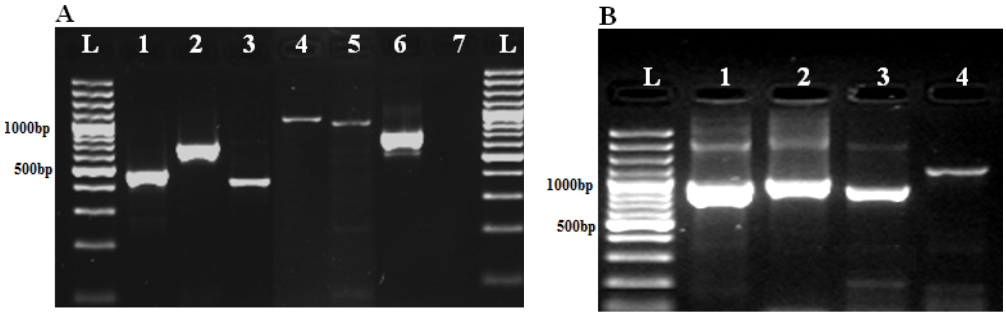



**Fig. 13.** Profil electroforetic evidențiind produși de amplificare (cADN-uri dublu catenare) obținuți prin revestranscripția ARNm și amplificarea PCR cu primeri specifici a cADN-urilor monocatenare corespunzătoare genelor: **A**. LALBA (câmpul 1), IGF1 (câmpul 2), STAT5A (câmpul 3), GHR (câmpul 4), PRLR (câmpul 5), DGAT1 (câmpul 6), control negativ (campul 7); **B.** GHR (câmpul 1), PRLR (câmpul 2), STAT5A (câmpul 3), GALT (câmpul 4 ); L: Ladder ADN 100pb plus (Fermentas, Vilnius, Lituania)

Secvențierea produșilor de amplificare obținuți conținând regiunile codificatoare ale celor șapte gene și analiza cromatogramelor de secvențiere, au evidențiat o serie de mutații care caracterizează alelele prezente la acești loci la indivizii din cele două rase de taurine. Secvențele obținute au fost comparate prin analiza Blast cu secvențele existente în baza de date GenBank, confirmând astfel apartenența lor la genele ținta analizate și la specie.

La **locusul genei IGF1** nu au fost evidențiate prin secvențiere mutații în regiunea codificatoare a genei la indivizii din cele două rase de taurine studiate. De aceea a fost studiat prin PCR-RFLP o substituție de tip citozină-timină (C/T) localizată în regiunea promotorului genei, regiune deosebit de importantă pentru expresia acestei gene.

La **locusul genei PRLR** a fost evidențiată prezența unei duble substituții de tip adenină-citozină/guanină-timină (AC/GT) localizată în exonul 3 (Figura 14; Carsai și colab, 2013a), care caracterizează cele două alele de la acest locus AC, respectiv GT.

La **locusul genei GHR** a fost evidențiată prezența unei substituții de tip timină/adenină (T/A) localizată în exonul 8 (Figura 14b; Carsai și colab., 2013b), care caracterizează cele două alele de la acest locus A, respectiv T.

La **locusul genei STAT5A** a fost evidențiată prezența unei substituții de tip timină/citozină (T/C) localizată în exonul 16 (Figura 14c), care caracterizează cele două alele de la acest locus T, respectiv C.

La **locusul genei DGAT1** a fost evidențiată prezența unei duble substituții de tip guanină-citozină/adenină-adenină (GC/AA) localizată în exonul 8 (Figura 14d), care caracterizează cele două alele de la acest locus GC, respectiv AA.

La **locusul genei GALT** a fost evidențiată prezența unei substituții de tip citozină/timină (C/T) localizată pe exonul 2 (Figura 14e), care caracterizează cele două alele de la acest locus C, respectiv T.

La **locusul genei LALBA** nu au fost evidențiate prin secvențiere mutații în regiunea codificatoare a genei la indivizii din cele două rase de taurine studiate.

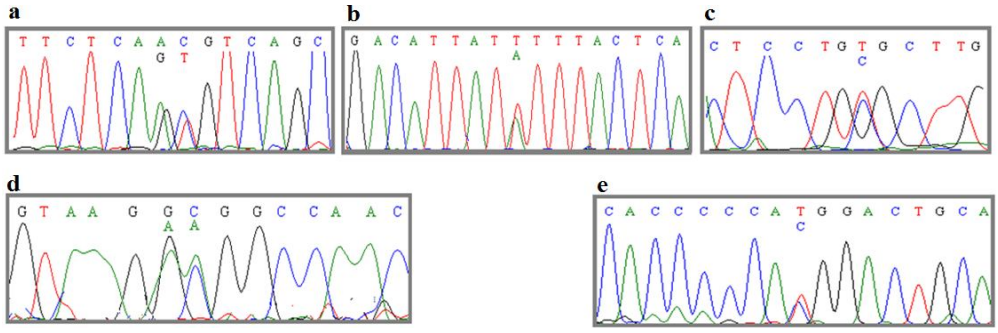



**Fig. 14.** Cromatograme de secvențiere evidențiind mutații evidențiate prin secvențierea cADN-urilor obținute din genele: **a**. PRLR; **b.** GHR; **c.** STAT5A; **d.** DGAT1; **e.** GALT, de la taurinele din cele două rase studiate

## 3.4. Rezultate privind genotipizarea la cei 10 loci și stabilirea structurii genetice în loturile de taurine analizate din rasele Balțată cu Negru Românească și Sura de Stepă

Genotipizarea la locii studiați a avut ca scop stabilirea structurii genetice la acești loci (calcularea frecvențelor alelelor și genotipurilor) și a fost realizată pe baza probelor de ADN extrase din sângele recoltat suplimentar de la indivizii din cele două rase de taurine care nu au fost genotipizați prin secvențiere. Testarea genetică a fost realizată prin tehnica PCR-RFLP și a avut la bază o parte din mutațiile evidențiate prin secvențierea celor 10 gene, unele dintre acestea fiind descrise și asociate în diverse studii cu cantitatea și calitatea laptelui la taurine (descrise în Capitolul I).

**Genotipizarea la locusul PIT1** a taurinelor luate în studiu a fost realizată pe baza substituției de tip adenină-guanină (A/G) localizată în situsul de restricție al enzimei *Hinf*I de pe fragmentul de 451pb amplificat din exonul 6 (Figura 10d). În urma digestiei acestui fragment au fost evidențiate două profile de restricție corespunzătoare la două genotipuri din cele trei posibile (Figura 15).

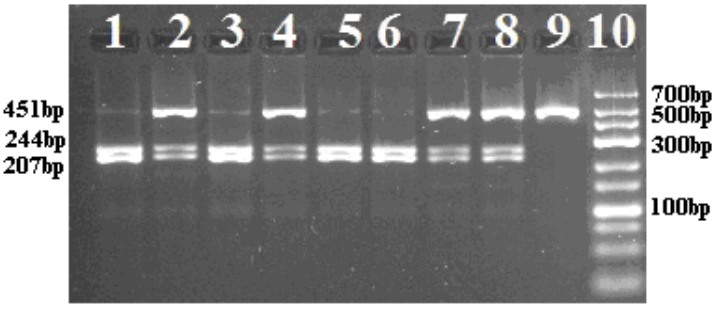



**Fig. 15.** Profil electroforetic evidențiind polimorfismul de tip *Hinf* I localizat în exonul 6 al genei PIT1. Câmpurile: 1, 3, 5 și 6 - genotipuri BB; câmpurile 2, 4, 7 și 8 - genotipuri AB; câmpul 9: produs PCR control de 451pb nedigerat; câmpul 10: Ladder ADN low range (Fermentas, Vilnius, Lituania)

Fragmentul de 451pb amplificat din alela B prezintă un situs de restricție pentru enzima *Hinf*I, în urma digestiei rezultând două fragmente de 244pb, respectiv 207pb. Substituția de tip A/G anulează situsul de restricție pentru această enzimă și prin urmare produsul nedigerat de 451pb este caracteristic alelei A (Carsai și colab., 2012).

La ambele rase studiate au fost observate doar genotipuri homozigote de tip BB, care corespund fragmentelor de 244pb, respectiv 207pb și genotipuri heterozigote de tip AB, care prezintă pe lângă cele două fragmente menționate și un fragment nedigerat de 451pb. La niciuna din cele două rase de taurine nu au fost evidențiate genotipuri homozigote de tip AA (Carsai și colab., 2012).

În urma centralizării datelor experimentale au fost calculate frecvențele alelelor și genotipurilor la cele două rase studiate (Tabelul 1).

**Tabelul 1**

Structura genetică la locusul PIT1 la rasele Balțată cu Negru Românească (lotul BNR-M, lotul BNR-S) și Sura de Stepă (lotul SS) în populațiile analizate

| **Rasa (lotul)** | **Numărul de indivizi genotipizați prin PCR-RFLP** | **Frecvența genotipurilor** | | | **Frecvența alelelor** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | AA | AB | BB | A | B |
| BNR-M | 60 | 0 | 0,182 | 0,818 | 0,091 | 0,909 |
| BNR-S | 60 | 0 | 0,200 | 0,800 | 0,100 | 0,900 |
| SS | 60 | 0 | 0,500 | 0,500 | 0,250 | 0,750 |

La ambele loturi de indivizi cu producție mare (BNR-M), respectiv cu producție mica de lapte (BNR-S), frecvențele observate ale genotipurilor AB, respectiv BB au fost apropiate. La rasa SS cele două genotipuri au avut frecvențe egale. Alela B a avut o frecvență foarte mare în comparație cu alela A la ambele loturi de indivizi din rasa BNR. În mod surprinzător frecvența alelei A la rasa Sura de Stepă a fost destul de mare în comparație cu frecvența acestei alele la rasa BNR (Carsai și colab., 2012).

**Genotipizarea la locusul GH** a taurinelor luate în studiu a fost realizată pe baza substituției de tip guanină-citozină (G/C) localizată în situsul de restricție al enzimei *Alu*I de pe fragmentul de 223pb amplificat din exonul 5 (Figura 11b). În urma digestiei acestui fragment au fost evidențiate două profile de restricție corespunzătoare la două genotipuri din cele trei posibile (Figura 16).

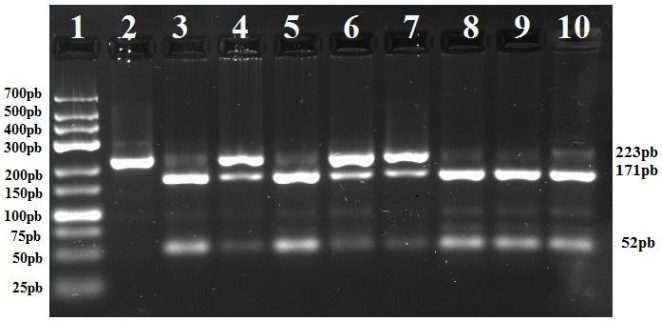



**Fig. 16.** Profil electroforetic evidențiind polimorfismul de tip *Alu*I localizat în exonul 5 al genei GH. Câmpul 1: Ladder ADN low range (Fermentas, Vilnius, Lituania); câmpul 2: produs PCR control de 223pb nedigerat; câmpurile: 3, 5, 8, 9 și 10 - genotipuri LL; câmpurile 4, 6 și 7 - genotipuri VL

Fragmentul de 223pb amplificat din alela L prezintă un situs de restricție pentru enzima *Alu*I, în urma digestiei rezultând două fragmente de 171pb, respectiv 52pb. Substituția de tip C (caracteristică alelei L)/ G (caracteristică alelei V) anulează situsul de restricție pentru această enzimă și prin urmare fragmentul amplificat din alela V nu este digerat de către enzima *Alu*I (Carsai și colab., 2011a).

La ambele rase studiate au fost observate doar genotipuri homozigote de tip LL, care corespund fragmentelor de 171, respectiv 52pb și genotipuri heterozigote de tip VL, care prezintă pe lângă cele două fragmente menționate și un fragment nedigerat de 223pb. La niciuna din cele două rase de taurine nu au fost evidențiate genotipuri homozigote de tip VV (Carsai și colab., 2011a).

În urma centralizării datelor experimentale au fost calculate frecvențele alelelor și genotipurilor la cele două rase studiate (Tabelul 2).

**Tabelul 2**

Structura genetică la locusul GH la rasele Balțată cu Negru Românească (lotul BNR-M, lotul BNR-S) și Sura de Stepă (lotul SS) în populațiile analizate

| **Rasa (lotul)** | **Numărul de indivizi genotipizați prin PCR-RFLP** | **Frecvența genotipurilor** | | | **Frecvența alelelor** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | LL | VL | VV | L | V |
| BNR-M | 60 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| BNR-S | 60 | 0,400 | 0,600 | 0 | 0,700 | 0,300 |
| SS | 60 | 0,625 | 0,375 | 0 | 0,812 | 0,188 |

La lotul BNR-M au fost observate în urma genotipizării doar genotipuri de tip LL. La lotul BNR-S frecvența genotipului VL a fost mai mare în comparație cu frecvența genotipului LL. La lotul SS frecvența genotipului LL a fost mai mare în comparație cu frecvența genotipului VL. Frecvența alelei L a fost egală cu 1 la indivizii din lotul BNR-M, alela V fiind absentă la acest lot. La indivizii din lotul BNR-S și indivizii din lotul SS frecvența alelei L a fost mai scazută, frecvența alelei V fiind destul de ridicată (Carsai și colab., 2011a).

Frecvența mare a alelei L la indivizii din lotul BNR-M are o semnificație pozitivă deoarece ea a fost asociată în diverse studii cu o producție mare de lapte. Acest lucru a fost explicat prin prezența unei cantități mai mari de hormon de creștere circulant în plasma sangvină la genotipurile LL, datorate unei expresii mai puternice a acestei alele (Schlee și colab., 1994).

**Genotipizarea la locusul PRL** a taurinelor luate în studiu a fost realizată pe baza substituției de tip adenină-guanină (A/G) localizată în situsul de restricție al enzimei *Rsa*I de pe fragmentul de 156pb amplificat din exonul 4 (Figura 12). În urma digestiei acestui fragment au fost evidențiate două profile

de restricție corespunzătoare la două genotipuri din cele trei posibile (Figura 17).

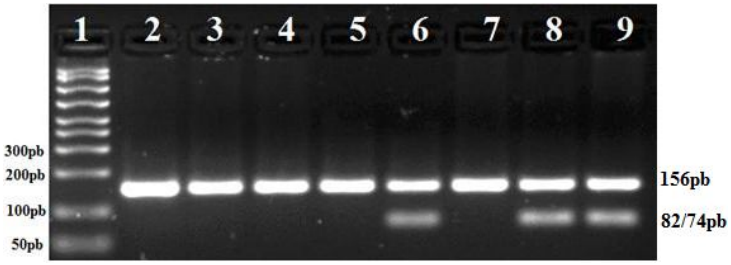



**Fig. 17.** Profil electroforetic evidențiind polimorfismul de tip *Rsa*I localizat în exonul 4 al genei PRL. Câmpul 1: Ladder ADN Ampli Size$^{TM}$ (BioRad Lab., Hercules, USA); câmpul 2: produs PCR control de 156pb nedigerat; câmpurile: 3, 4, 5 și 7 - genotipuri AA; câmpurile 6, 8 și 9 - genotipuri AB

Fragmentul de 156pb amplificat din alela A nu prezintă situsuri de restricție pentru enzima *Rsa*I și prin urmare nu este digerat de către această enzimă. Substituția de tip A/G, localizată pe fragmentul amplificat, crează un situs de restricție pentru această enzimă și ca urmare prin digestie rezultă două fragmente de 82pb, respectiv 74pb, caracteristice alelei B (Carsai și colab., 2011b).

La ambele rase studiate au fost observate doar genotipuri homozigote de tip AA, care corespund fragmentului nedigerat de 156pb, respectiv genotipuri heterozigote de tip AB, caracterizate prin prezența suplimentară a celor două fragmente de 82pb, respectiv 74pb, fragmente care comigrează în gelul de agaroză datorită diferenței mici de lungime dintre ele. Nu au fost identificate genotipuri homozigote de tip BB (Carsai și colab., 2011b).

În urma centralizării datelor experimentale au fost calculate frecvențele alelelor și genotipurilor la cele două rase studiate (Tabelul 3).

**Tabelul 3**

Structura genetică la locusul PRL la rasele Balțată cu Negru Românească (lotul BNR-M, lotul BNR-S) și Sura de Stepă (lotul SS) în populațiile analizate

| **Rasa (lotul)** | **Numărul de indivizi genotipizați prin PCR-RFLP** | **Frecvența genotipurilor** | | | **Frecvența alelelor** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | AA | AB | BB | A | B |
| BNR-M | 60 | 0,727 | 0,273 | 0 | 0,864 | 0,136 |
| BNR-S | 60 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| SS | 60 | 0,571 | 0,429 | 0 | 0,786 | 0,214 |

La lotul BNR-M frecvența genotipului AA a fost mult mai mare în comparație cu a genotipului BB, aceasta atingând valoarea 1 în cazul lotului BNR-S. La lotul SS cele două genotipuri au avut frecvențe apropiate. Alela A a avut o frecvență foarte mare în comparație cu a alelei B la ambele rase (Carsai și colab., 2011b).

**Genotipizarea la locusul IGF1** a taurinelor luate în studiu a fost realizată pe baza substituției de tip citozină-timină (C/T) localizată în situsul de restricție al enzimei *Sna*BI de pe fragmentul de 249pb amplificat din regiunea promotorului genei IGF1. În urma digestiei acestui fragment au fost evidențiate trei profile de restricție corespunzătoare la trei genotipuri (Figura 18).

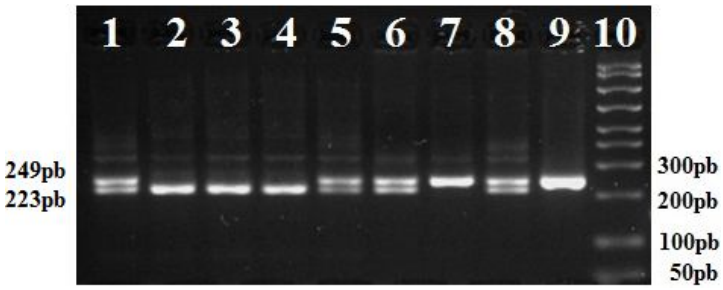



**Fig. 18.** Profil electroforetic evidențiind polimorfismul de tip *Sna*BI localizat în regiunea promotorului genei IGF1. Câmpurile: 1, 5, 6 și 8- genotipuri CT; câmpurile 2, 3 și 4 - genotipuri TT; câmpul 7 genotip CC; câmpul 9: produs PCR control de 249pb nedigerat; câmpul 10: Ladder ADN Ampli Size$^{TM}$ (BioRad Lab., Hercules, USA)

Fragmentul de 249pb amplificat din alela C nu prezintă situsuri de restricție pentru enzima *Sna*BI și prin urmare nu este digerat de către această enzimă. Substituția de tip C/T, localizată pe fragmentul amplificat, creează un situs de restricție pentru această enzimă și ca urmare prin digestie rezultă două fragmente de 223pb, respectiv 26pb caracteristice alelei T.

La ambele rase studiate au fost observate toate cele trei genotipuri posibile și anume: genotipuri CC care corespund fragmentului nedigerat de 256pb, genotipuri TT care corespund fragmentelor de 223pb, respectiv 26pb și genotipuri CT care prezintă toate cele trei fragmente. Fragmentul de 26pb nu a putut fi vizualizat în gel datorită mărimii foarte reduse.

În urma centralizării datelor experimentale au fost calculate frecvențele alelelor și genotipurilor la cele două rase studiate (Tabelul 4).

**Tabelul 4**

Structura genetică la locusul IGF1 la rasele Balțată cu Negru Românească (lotul BNR-M, lotul BNR-S) și Sura de Stepă (lotul SS) în populațiile analizate

| **Rasa (lotul)** | **Numărul de indivizi genotipizați prin PCR-RFLP** | **Frecvența genotipurilor** | | | **Frecvența alelelor** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CC | CT | TT | C | T |
| BNR-M | 60 | 0,273 | 0,545 | 0,182 | 0,545 | 0,455 |
| BNR-S | 60 | 0,600 | 0,400 | 0 | 0,800 | 0,200 |
| SS | 60 | 0,125 | 0,500 | 0,375 | 0,375 | 0,625 |

La loturile BNR-M și SS frecvența genotipului CT a fost mult mai mare în comparație cu frecvențele celorlalte două genotipuri CC, respectiv TT. Genotipul CC a avut frecvență cea mai mare la lotul BNR-S. La indivizii rasa BNR frecvența alelei C a fost mai mare în comparație cu frecvența alelei T. La indivizii din rasa SS frecvența alelei T a fost mai mare în comparație cu frecvența alelei C.

**Genotipizarea la locusul PRLR** a taurinelor luate în studiu a fost realizată pe baza dublei substituții de tip adenină-citozină/guanină-timină (AC/GT) localizată în situsul de restricție al enzimei *Bse*MII de pe fragmentul de 186pb amplificat din exonul 3 (Figura 14a). În urma digestiei acestui fragment au fost evidențiate două profile de restricție corespunzătoare la două genotipuri din cele trei posibile (Figura 19).

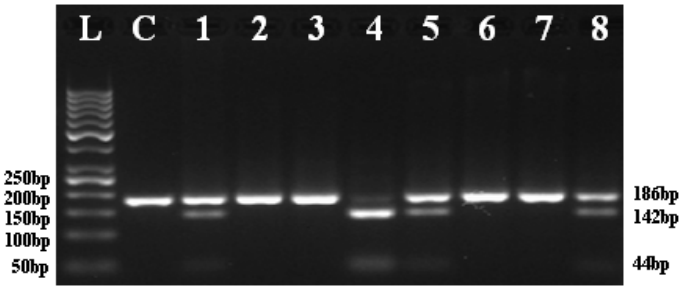



**Fig. 19.** Profil electroforetic evidențiind polimorfismul de tip *Bse*MII localizat în exonul 3 al genei PRLR; L: 50pb ADN ladder (Fermentas, Vilnius, Lithuania); C - produs PCR control de 186pb nedigerat; câmpurile: 1, 5 și 8 - genotipuri AC-GT; câmpurile 2, 3, 6 și 7 - genotipuri AC-AC; câmpul 4 - genotip GT-GT

Fragmentul de 186pb amplificat din alela AC nu conține situsuri de restricție pentru enzima *Bse*MII și prin urmare nu este digerat de către această enzimă. Dubla subsituție de tip AC/GT crează un situs nou de restricție pentru această enzimă și ca urmare prin digestie rezultă două fragmente de 142pb, respectiv 44pb caracteristice alelei GT (Carsai și colab, 2013a).

Analiza profilelor electroforetice a evidențiat la indivizii din lotul SS prezența a trei genotipuri și anume: genotipuri homozigote de tip AC-AC care corespund fragmentelor nedigerate de 186pb, genotipuri homozigote de tip GT-GT care corespund fragmentelor de 142pb, respectiv 44pb și genotipuri heterozigote de tip AC-GT care prezintă toate cele trei fragmente.

La loturile BNR-M și BNR-S au fost evidențiate doar două genotipuri, AC-AC, respectiv AC-GT (Carsai și colab, 2013a).

În urma centralizării datelor experimentale au fost calculate frecvențele alelelor și genotipurilor la cele două rase studiate (Tabelul 5).

**Tabelul 5**

Structura genetică la locusul PRLR la rasele Balțată cu Negru Românească (lotul BNR-M, lotul BNR-S) și Sura de Stepă (lotul SS) în populațiile analizate

| **Rasa (lotul)** | **Numărul de indivizi genotipizați prin PCR-RFLP** | **Frecvența genotipurilor** | | | **Frecvența alelelor** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | AC-AC | AC-GT | GT-GT | AC | GT |
| BNR-M | 60 | 0,455 | 0,545 | 0 | 0,727 | 0,273 |
| BNR-S | 60 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| SS | 60 | 0,500 | 0,375 | 0,125 | 0,688 | 0,312 |

La loturile BNR-M și SS frecvențele genotipurilor AC-AC și a genotipurilor AC-GT au fost relativ apropiate. Frecvența cea mai mare a fost constatată în cazul lotului BNR-S la care frecvența genotipului AC-AC a atins valoarea 1. Frecvențele alelelor AC, respectiv GT au avut valori apropiate la loturile BNR-M, respectiv SS. La indivizii din lotul BNR-S frecvența alelei AC a atins valoarea 1, alela GT nefiind identificată (Carsai și colab, 2013a).

**Genotipizarea la locusul GHR** a taurinelor luate în studiu a fost realizată pe baza substituției de tip timină/adenină (T/A) localizată pe fragmentul de 175pb amplificat din exonul 8 (Figura 14b). Crearea artificială a unui situs nou de restricție pentru enzima *Ssp*I a permis în urma digestiei acestui fragment evidențierea a trei profile de restricție corespunzătoare la trei genotipuri (Figura 20).

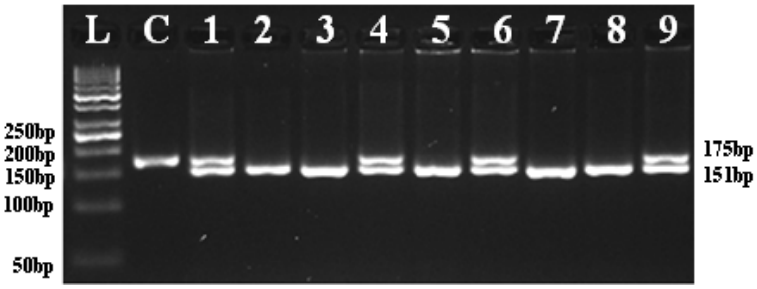



**Fig. 20.** Profil electroforetic evidențiind două din cele trei genotipuri posibile care apar datorită polimorfismul de tip *Ssp*I localizat în exonul 8 al genei GHR; L: 50pb ADN ladder (Fermentas, Vilnius, Lithuania); C - produs PCR control de 175pb nedigerat; câmpurile: 1, 4, 6 și 9 - genotipuri AT; câmpurile 2, 3, 5, 7 și 8 - genotipuri TT

Fragmentul de 175pb amplificat din alela T conține un situs de restricție pentru enzima *Ssp*I creat artificial, în urma digestiei rezultând două fragmente de 151pb, respectiv 24pb (fragment nevizibil în gel datorită dimensiunii reduse) caracteristice alelei T. Substituția de tip T/A face ca acest situs de restricție creat artificial să fie anulat și prin urmare fragmentul amplificat din alela A nu este digerat de către această enzimă (Carsai și colab., 2013b).

Analiza profilelor electroforetice a evidențiat la indivizii din lotul BNR-S prezența a trei genotipuri și anume: genotipuri homozigote de tip TT care corespund fragmentelor digerate de 151pb, respectiv 24pb, genotipuri homozigote de tip AA care corespund fragmentelor nedigerate de 175pb și genotipuri heterozigote de tip TA care prezintă toate cele trei fragmente.

La lotul BNR-M au fost evidențiate doar două genotipuri de tip TT, respectiv TA, iar la lotul SS au fost evidențiate doar genotipuri de tip TT (Carsai și colab., 2013b).

În urma centralizării datelor experimentale au fost calculate frecvențele alelelor și genotipurilor la cele două rase studiate (Tabelul 6).

**Tabelul 6**

Structura genetică la locusul GHR la rasele Balțată cu Negru Românească (lotul BNR-M, lotul BNR-S) și Sura de Stepă (lotul SS) în populațiile analizate

| **Rasa (lotul)** | **Numărul de indivizi genotipizați prin PCR-RFLP** | **Frecvența genotipurilor** | | | **Frecvența alelelor** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | TT | TA | AA | T | A |
| BNR-M | 60 | 0,545 | 0,455 | 0 | 0,773 | 0,227 |
| BNR-S | 60 | 0,400 | 0,400 | 0,200 | 0,600 | 0,400 |
| SS | 60 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

La loturile BNR-M și BNR-S frecvențele observate ale genotipurilor TT și TA au fost relativ apropiate. Frecvența maximă a genotipului TT a fost constatată în cazul lotului SS. Frecvențele alelelor T și A au avut valori de apropiate în loturile BNR-M, respectiv BNR-S. În lotul SS frecvența alelei T a atins valoarea 1, alela A nefiind identificată (Carsai și colab., 2013b).

**Genotipizarea la locusul STAT5A** a taurinelor luate în studiu a fost realizată pe baza substituției de tip timină/citozină (T/C) localizată în situsul de restricție al enzimei *Rse*I de pe fragmentul de 281pb amplificat din exonul 16 (Figura 14c). În urma digestiei fragment au fost evidențiate două profile de restricție corespunzătoare la două genotipuri din cele trei posibile (Figura 21).

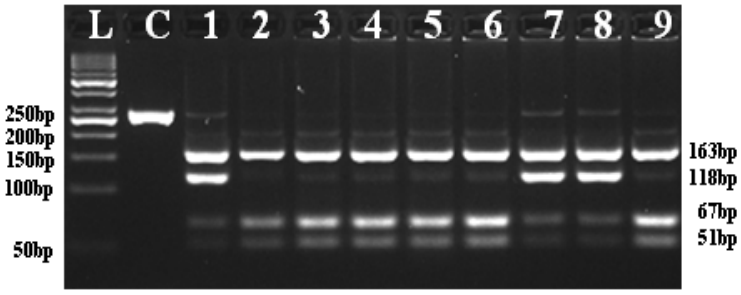



**Fig. 21.** Profil electroforetic evidențiind polimorfismul de tip *Rse*I localizat în exonul 16 al genei STAT5A; L: 50pb ADN ladder (Fermentas, Vilnius, Lithuania); C - produs PCR control de 281pb nedigerat; câmpurile: 1, 7 și 8 - genotipuri CT; câmpurile 2, 3, 4, 5, 6 și 9 - genotipuri TT

Fragmentul de 281pb amplificat din alela T conține două situsuri de restricție pentru enzima *Rse*I, în urma digestiei rezultând trei fragmente de 163pb, 67pb, respectiv 51pb caracteristice alelei T. Substituția de tip T/C anulează unul din situsurile de restricție pentru această enzimă și ca urmare prin digestie rezultă două fragmente de 163pb, respectiv 118pb caracteristice alelei C.

Analiza profilelor electroforetice a evidențiat la indivizii din lotul BNR-M prezența a două genotipuri și anume: genotipuri homozigote de tip TT care corespund fragmentelor digerate de 163pb, 67pb, respectiv 51pb și genotipuri heterozigote de tip CT care pe lângă cele trei fragmente prezintă suplimentar un fragment de 118pb. La loturile BNR-S, repectiv SS a fost evidențiat doar genotipul TT. Genotipul homozigot de tip CC, caracterizat prin prezența a două fragmente de 163pb, respectiv 118pb, nu a fost identificat la niciuna din cele două rase.

În urma centralizării datelor experimentale au fost calculate frecvențele alelelor și genotipurilor la cele două rase studiate (Tabelul 7).

**Tabelul 7**

Structura genetică la locusul STAT5A la rasele Balțată cu Negru Românească (lotul BNR-M, lotul BNR-S) și Sura de Stepă (lotul SS) în populațiile analizate

| **Rasa (lotul)** | **Numărul de indivizi genotipizați prin PCR-RFLP** | **Frecvența genotipurilor** | | | **Frecvența alelelor** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | TT | CT | CC | T | C |
| BNR-M | 60 | 0,636 | 0,364 | 0 | 0,818 | 0,182 |
| BNR-S | 60 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| SS | 60 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

La lotul BNR-M frecvența genotipului TT a fost aproape dublă în comparație cu a genotipului CT, frecvența genotipului CC fiind 0. Frecvența cea mai mare a genotipului TT a fost constatată în loturilor BNR-S și SS unde a

atins valoarea 1. La indivizii din lotul BNR-M frecvența alelei T a fost foarte mare în comparație cu frecvența alelei C. La indivizii din loturile BNR-S, respectiv SS frecvența alelei T a atins valoarea 1, alela C nefiind identificată.

**Genotipizarea la locusul DGAT1** a taurinelor luate în studiu a fost realizată pe baza dublei substituții de tip guanină-citozină/adenină-adenină (GC/AA) localizată în situsul de restricție al enzimei *Tau*I de pe fragmentul de 179pb amplificat din exonul 8 (Figura 14d). În urma digestiei acestui fragment au fost evidențiate două profile de restricție corespunzătoare la două genotipuri din cele trei posibile (Figura 22).

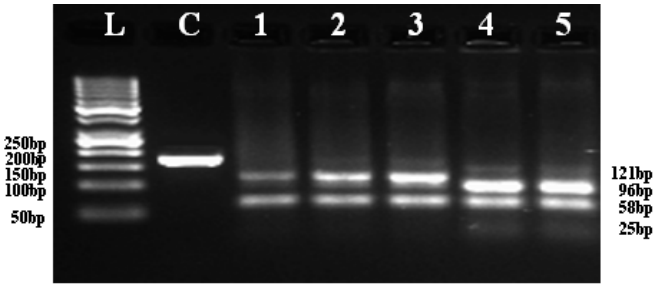



**Fig. 22.** Profil electroforetic evidențiind polimorfismul de tip *Tau*I localizat în exonul 8 al genei DGAT1; L: 50pb ADN ladder (Fermentas, Vilnius, Lithuania); C - produs PCR control de 179pb nedigerat; câmpurile: 1, 2 și 3 - genotipuri AA-GC; câmpurile 4 și 5 - genotipuri GC-GC.

Fragmentul de 179pb amplificat din alela GC conține două situsuri de restricție pentru enzima *Tau*I, în urma digestiei rezultând trei fragmente de 96pb, 58pb, respectiv 24pb caracteristice alelei GC. Substituția de tip GC/AA anulează unul din situsurile de restricție pentru această enzimă de pe fragmentul amplificat și ca urmare prin digestie rezultă doar două fragmente de 121pb, respectiv 58pb caracteristice alelei AA.

Analiza profilelor electroforetice a evidențiat la indivizii din loturile BNR-M și BNR-S prezența a două genotipuri și anume: genotipuri homozigote de tip GC-GC care corespund fragmentelor digerate de 96pb, 58pb, respectiv 24pb și

genotipuri heterozigote de tip AA-GC care pe lângă cele trei fragmente prezintă suplimentar un fragment de 121pb. La lotul SS a fost evidențiat doar genotipul GC-GC. Genotipul homozigot de tip AA-AA, caracterizat prin prezența a două fragmente de 121pb, respectiv 58pb, nu a fost identificat la niciuna din cele două rase.

În urma centralizării datelor experimentale au fost calculate frecvențele alelelor și genotipurilor la cele două rase studiate (Tabelul 8).

**Tabelul 8**

Structura genetică la locusul DGAT1 la rasele Balțată cu Negru Românească (lotul BNR-M, lotul BNR-S) și Sura de Stepă (lotul SS) în populațiile analizate

| **Rasa (lotul)** | **Numărul de indivizi genotipizați prin PCR-RFLP** | **Frecvența genotipurilor** | | | **Frecvența alelelor** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | GC-GC | AA-GC | AA-AA | GC | AA |
| BNR-M | 60 | 0,818 | 0,182 | 0 | 0,909 | 0,091 |
| BNR-S | 60 | 0,400 | 0,600 | 0 | 0,700 | 0,300 |
| SS | 60 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

La lotul SS cea mai mare frecvență s-a constatat în cazul genotipului GC-GC (egală cu 1), celelalte două genotipuri posibile având o frecvență egală cu 0. La lotul BNR-M frecvența genotipului GC-GC a fost de aproximativ patru ori mai mare în comparație cu cea a genotipului AA-GC. La lotul BNR-S frecvența genotipului AA-GC a fost mai mare în comparație cu cea a genotipului GC-GC. La toate cele trei loturi frecvența alelei GC a fost mult mai mare în comparație cu cea a alelei AA, atingând valoarea 1 la lotul SS. Frecvența cea mai mare a alelei AA s-a constatat în lotul BNR-S, ea nefiind identificată în lotul SS.

**Genotipizarea la locusul GALT** a taurinelor luate în studiu a fost realizată pe baza substituției de tip citozină/timină (C/T) localizată în situsul de restricție al enzimei *Nco*I de pe fragmentul de 301pb amplificat din exonul 2 (Figura 14e).

În urma digestiei acestui fragment au fost evidențiate trei profile de restricție corespunzătoare la trei genotipuri (Figura 23).

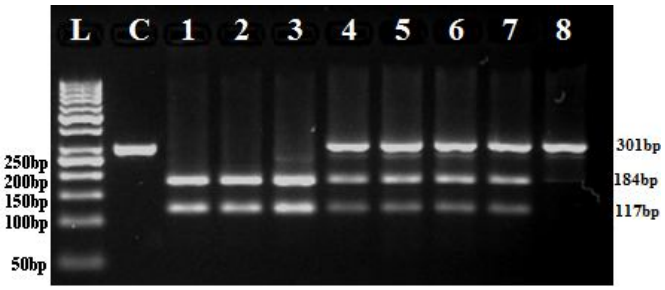



**Fig. 23.** Profil electroforetic evidențiind polimorfismul de tip *Nco*I localizat în exonul 2 al genei GALT; L: 50pb ADN ladder (Fermentas, Vilnius, Lithuania); C - produs PCR control de 301pb nedigerat; câmpurile: 1, 2 și 3 - genotipuri TT; câmpurile 4, 5, 6 și 7- genotipuri CT; câmpul 8- genotipuri CC.

Fragmentul de 301pb amplificat din alela C nu conține situsuri de restricție pentru enzima *Nco*I și prin urmare nu este digerat de către această enzimă. Substituția de tip C/T crează un situs nou de restricție pentru această enzimă și ca urmare prin digestie rezultă două fragmente de 184pb, respectiv 117pb caracteristice alelei T.

Analiza profilelor electroforetice a evidențiat la indivizii din lotul SS prezența a trei genotipuri și anume: genotipuri homozigote de tip TT care corespund fragmentelor digerate de 184pb, respectiv 117pb, genotipuri homozigote de tip CC care corespund fragmentelor nedigerate de 301pb și genotipuri heterozigote de tip CT care prezintă toate cele trei fragmente. La loturile BNR-M și BNR-S au fost evidențiate doar genotipuri de tip TT.

În urma centralizării datelor experimentale au fost calculate frecvențele alelelor și genotipurilor la cele două rase studiate (Tabelul 9).

**Tabelul 9**

Structura genetică la locusul GALT la rasele Balțată cu Negru Românească (lotul BNR-M, lotul BNR-S) și Sura de Stepă (lotul SS) în populațiile analizate

| **Rasa (lotul)** | **Numărul de indivizi genotipizați prin PCR-RFLP** | **Frecvența genotipurilor** | | | **Frecvența alelelor** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | TT | CT | CC | T | C |
| BNR-M | 60 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| BNR-S | 60 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| SS | 60 | 0,375 | 0,500 | 0,125 | 0,625 | 0,375 |

La loturile BNR-M și BNR-S a fost identificat un singur genotip (genotipul TT) cu frecvența egală cu 1. La lotul SS cea mai mare frecvență s-a constatat în cazul genotipului CT, această frecvență fiind relativ apropiată de cea a genotipului TT. Genotipul CC a fost identificat doar la lotul SS. Frecvența maximă a alelei T a fost constatată în ambele loturi din rasa BNR (egală cu 1). La rasa SS frecvența alelei C a fost mai mare în comparație cu cea a alelei T.

**Genotipizarea la locusul LALBA** a taurinelor luate în studiu, realizată prin secvențierea cADN, a evidențiat prezența unei singure alele (B) și a unui singur genotip (BB) la toate cele trei loturi de taurine.

## 3.5. Rezultate privind estimarea influenței pe care o au combinațiile alelice întâlnite la cei 10 loci asupra capacității lactogene a glandei mamare la cele două rase de taurine

Producția de lapte este un caracter complex controlat de multiple gene (poligene), care intervin direct sau indirect prin produșii lor de expresie în diferite etape ale dezvoltării și fiziologiei glandei mamare. Alegerea celor 10 gene în studiul nostru a avut ca motivație fapul ca ele reprezintă actorii cei mai importanți care controlează creșterea și diferențierea structurală și functională a

epiteliului mamar secretor, declanșarea lactației și sinteza componenților laptelui, menținerea secreției lactate și apoi intrarea în repaus a glandei mamare.

Așa cum a fost menționat o parte din mutațiile (variații alelice) apărute în structura acestor gene care codifică hormoni, factori de creștere, de transcripție ori enzime și care sunt răspunzatoare de dezvoltarea și funcționarea glandei mamare, pot determina modificări în timpul oricarei faze a lactației și pot avea un efect pozitiv sau negativ asupra dezvoltării glandei mamare, capacității ei lactogene și implicit asupra producției cantitative și calitative de lapte (Balteanu, 2010a).

Rezultatele obținute în urma genotipizării la cei 10 loci a celor trei loturi de indivizi din cele două rase de taurine, au evidențiat diferitele combinații alelice care apar la acești loci (Tabelul 10).

**Tabelul 10**

Câteva din combinațiile alelice întâlnite cel mai frecvent la cei 10 loci la indivizii din cele trei loturi de taurine studiate

**1) Lotul BNR-M**

| **Număr de identificare** | **LOCUS** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **PIT1** | **GH** | **PRL** | **IGF1** | **PRLR** |
| | **GENOTIP** | | | | |
| 4 BNR-M | BB | LL | AB | CT | AC/GT |
| 5 BNR-M | BB | LL | AB | TT | AC/AC |
| 6 BNR-M | AB | LL | AA | TT | AC/GT |
| 9 BNR-M | BB | LL | AA | CT | AC/GT |
| 10 BNR-M | BB | LL | AA | CT | AC/AC |

| **Număr de identificare** | **LOCUS** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **GHR** | **STAT5A** | **DGAT1** | **GALT** | **LALBA** |
| | **GENOTIP** | | | | |
| 4 BNR-M | TT | CT | GC/GC | TT | BB |
| 5 BNR-M | TT | CT | GC/GC | TT | BB |
| 6 BNR-M | AT | TT | GC/GC | TT | BB |
| 9 BNR-M | TT | TT | GC/GC | TT | BB |
| 10 BNR-M | TT | TT | GC/GC | TT | BB |

## 2) Lotul BNR-S

| **Număr de identificare** | **LOCUS** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **PIT1** | **GH** | **PRL** | **IGF1** | **PRLR** |
| | **GENOTIP** | | | | |
| 12 BNR-S | AB | LL | AA | CC | AC/AC |
| 13 BNR-S | BB | LL | AA | CC | AC/AC |
| 14 BNR-S | BB | VL | AA | CT | AC/AC |
| 15 BNR-S | BB | VL | AA | CC | AC/AC |
| 16 BNR-S | BB | VL | AA | CT | AC/AC |

| **Număr de identificare** | **LOCUS** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **GHR** | **STAT5A** | **DGAT1** | **GALT** | **LALBA** |
| | **GENOTIP** | | | | |
| 12 BNR-S | AT | TT | GC/GC | TT | BB |
| 13 BNR-S | AT | TT | GC/GC | TT | BB |
| 14 BNR-S | TT | TT | AA/GC | TT | BB |
| 15 BNR-S | TT | TT | AA/GC | TT | BB |
| 16 BNR-S | AA | TT | AA/GC | TT | BB |

## 3) Lotul SS

| **Număr de identificare** | **LOCUS** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **PIT1** | **GH** | **PRL** | **IGF1** | **PRLR** |
| | **GENOTIP** | | | | |
| 1SS | BB | LL | AA | CT | AC/GT |
| 2SS | AB | VL | AA | TT | AC/AC |
| 3SS | BB | LL | AA | TT | AC/AC |
| 4SS | AB | VL | AB | TT | AC/GT |
| 5SS | BB | VL | AA | CT | AC/AC |

| **Număr de identificare** | **LOCUS** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **GHR** | **STAT5A** | **DGAT1** | **GALT** | **LALBA** |
| | **GENOTIP** | | | | |
| 1SS | TT | CC | GC/GC | CC | BB |
| 2SS | TT | CC | GC/GC | CT | BB |
| 3SS | TT | CC | GC/GC | CT | BB |
| 4SS | TT | CC | GC/GC | CT | BB |
| 5SS | TT | CC | GC/GC | CT | BB |

O serie de studii (menționate în Capitolul 1) au fost focalizate pe evaluarea efectului individual al polimorfismului unora dintre acești loci asupra cantității și calității laptelui. Rezultatele au fost de multe ori contradictorii lucru influențat în principal de luarea în considerare în majoritatea studiilor de asociere numai a uneia sau două dintre aceste gene pe aceeași populație.

În cadrul proiectului nostru am studiat polimorfismul combinat a 10 gene pe aceeași indivizi, având avantajul luării în studiu a două rase aflate la extreme în privința gradului de dezvoltare al glandei mamare și al producției cantitative și calitative de lapte.

**La locusul PIT1** genotipul AA a fost asociat cu o cantitate mai mare de lapte în comparație cu celelalte genotipuri (Renaville și colab., 1997; Mattos și colab., 2004; Zwierzchowski și colab., 2002; Oshima și colab., 2003), o cantitate mai mare de proteină, o adâncime mai mare a corpului și angularitate (Renaville și colab., 1997). Din contră în alte studii nu s-au stabilit asocieri între aceste genotipuri și producția de lapte (Dybus și colab., 2004; Zakizadeh și colab., 2007). **În prezentul studiu** genotipul homozigot AA nu a fost identificat, alela A prezentând o frecvență relativ scazută la toate cele trei loturi de indivizi. În mod surprinzator frecvența alelei A la lotul SS a fost destul de mare în comparație cu loturile BNR (Carsai și colab., 2012).

**La locusul GH** genotipul LL a fost asociat cu o cantitate mai mare de grăsime și proteină (Dybus, 2002), cu o cantitate mai mare de lapte (Lucy și

colab., 1993; Lee și colab., 1996; Dybus și colab., 2002; Yardibi și colab., 2009) și procent mai mare de grăsime (Yardibi și colab., 2009). Acest lucru a fost explicat prin prezența unei cantități mai mari de hormon de creștere circulant în plasma sangvină la genotipurile LL, datorate unei expresii mai puternice a alelei L (Schlee și colab., 1994). Din contră în alte studii genotipul VV a fost asociat cu o cantitate mai mare de lapte și o compoziție mai bună (Sabour și colab., 1997; Zwierzchowski și colab., 2002). **În prezentul studiu** genotipul LL a fost singurul identificat la lotul BNR-M. La loturile BNR-S și SS genotipul VL a fost identificat cu o frecvență destul de mare, sugerând o influență negativă asupra cantității de lapte. Acest lucru a fost în concordanță cu fenotipul observat la cele două loturi de indivizi (Carsai și colab., 2011a).

**La locusul PRL** genotipul AA a fost asociat cu un procent mai mare de proteină (Dybus și colab., 2005), un procent superior de grăsime (Miceikiene și colab., 2006) și o cantitate mai mare de lapte (Ghasemi și colab., 2009). Cu toate acestea rezultatele obținute în alte studii au fost contradictorii (Chung și colab., 1996; Chrenek și colab., 1999; Dybus, 2002). **În prezentul studiu** genotipul AA a avut frecvența cea mai mare la indivizii din lotul BNR-S (egală cu 1), la indivizii din lotul SS a avut o frecvență medie, iar la indivizii din lotul BNR-M a avut o frecvență intermediară (Carsai și colab., 2011b).

**La locusul IGF1** genotipul CT a fost asociat semnificativ cu o cantitate mai mare de grăsime și proteină în lapte (Siadkowska și colab., 2006) și cu un procent mai mare de grăsime și proteină (Mehmannavaz și colab., 2010), efect datorat alelei T. **În prezentul studiu** frecvențele genotipului CT au fost apropiate la cele trei loturi de indivizi. Cea mai mare frecvență a alelei T a fost constatată la lotul SS, acest lucru fiind în concordanță cu fenotipul observat la rasa SS privitor la procentul mai mare de grăsime și proteină din lapte.

**La locusul PRLR** genotipul GT-GT a fost asociat cu o cantitate mai mare de grăsime și proteină în lapte (Viitala și colab., 2006). **În prezentul studiu**

acest genotip a înregistrat cea mai mare frecvență la lotul SS. Frecvențele observate ale alelelor AC, respectiv GT, au avut valori apropiate la indivizii din loturile BNR-M și SS (Carsai și colab, 2013a).

**La locusul GHR** genotipul TT a fost asociat cu un procent mai mare de proteină și grăsime și cu într-o mai mică masură o cantitate mai mare de lapte (Blott și colab., 2003; Viitala și colab., 2006; Sun și colab., 2009). **În prezentul studiu** la indivizii din loturile BNR-M și BNR-S frecvențele observate ale genotipurilor TT și TA au avut valori apropiate. La indivizii din lotul SS frecvența alelei T a atins valoarea 1, acest lucru fiind în concordanță cu procentul mai mare de proteină și grăsime observat la această rasă (Carsai și colab, 2013b) și la alte rase (Blott și colab., 2003; Viitala și colab., 2006; Sun și colab., 2009), dar în contradicție cu efectul pozitiv asupra cantității de lapte observat la alte rase (Blott și colab., 2003).

**La locusul STAT5A** genotipul CT a fost asociat cu o cantitate mai mare de lapte și un procent mai mare de substanță uscată, proteină și lactoză (Flisikowski și colab., 2004), respectiv cu o cantitate mai mare de proteină în lapte (Sadeghi și colab., 2008), efect datorat alelei C. **În prezentul studiu** genotipul CT și alela C au fost identificate doar la lotul BNR-M.

**La locusul DGAT1** genotipul AA-AA a fost asociat creșterea procentului de grăsime din lapte (Spelman și colab., 2002; Weler și colab., 2003; Grisard și colab., 2002; Sanders și colab., 2006; Gautier și colab., 2007; Näslund și colab., 2008). În urma unui studiu de expresie s-a constatat ca proteina codificată de alela AA are o activitate enzimatică mai mare decât cea codificată de alela GC. **În prezentul studiu** alela AA a fost identificată doar în stadiu heterozigot cu frecvența cea mai mare la lotul BNR-S. Deși s-a sugerat ca alela AA ar fi cea ancestrală care a apărut înainte de domesticirea taurinelor (Winter și colab., 2002; Kaupe și colab., 2004), totuși ea nu a fost identificată la indivizii genotipizați din rasă ancestrală SS.

**La locusul GALT** nu exista studii privitoare la posibile asocieri între polimorfismele acestei gene și producția de lapte, deoarece gena nu a fost studiată la taurine sub acest aspect. **În prezentul studiu** a rezultat o diferențiere netă între indivizii din rasa BNR (M sau S) și cei din rasa SS. Astfel la loturile BNR (M sau S) a fost identificată o sigură alelă (T) în stare homozigotă (TT), în timp ce la lotul SS a fost identificată o nouă alelă C cu o frecvență destul de mare. Având în vedere rolul enzimei GALT în sinteza lactozei, polimorfismul identificat în cadrul acestei gene ar putea fi studiat în continuare privind posibilele lui asocieri cu cantitatea și calitatea laptelui.

**La locusul LALBA** nu exista studii privind asocierea acestei gene cu variația producției de lapte, din cauza lipsei de polimorfism în regiunea codificatoare a acestui locus la taurinele ameliorate. **În prezentul studiu** s-a constatat prezența unei singure alele B și a unui singur genotip de tip BB la toate cele trei loturi de taurine studiate.

Sintetizând, putem observa în Tabelul 10 combinațiile alelice identificate la cei 10 loci care au variat în cadrul aceleași lot, deși fenotipic au fost aleși indivizi omogeni în ceea ce privește gradul de dezvoltare al glandei mamare și al producției cantitative de lapte. Acest lucru sugerează că toate aceste combinații alelice posibile pot contribui la efectul fenotipic observat. Modul în care aceste substituții nucleotidice (polimorfisme alelice) întâlnite la cei 10 loci cheie studiați pot influența semnificativ creșterea și capacitatea lactogenă a glandei mamare, se poate explica prin efectul pe care îl pot avea asupra:

- **nivelului de expresie al genelor implicate care determină modificarea cantității de proteină specifică sintetizată**. De exemplu, creșterea cantității de hormon de creștere circulant, datorat în unele cazuri hiperexpresiei genei care îl codifică, are efect stimulativ imediat asupra creșterii cantității de lapte. Acest lucru se poate explica prin efectul stimulativ pe care îl are acest hormon, prin intermediul IGF1, asupra diviziunii celulare și diferențierii țesutului mamar

lactogen. Același efect se constată și în cazul aportului exongen de hormon de creștere prin injecții.

➢ **compoziției în aminoacizi a proteinelor specifice codificate de genele implicate, ceea ce poate avea repercursiuni asupra conformației și activității ei biologice ca factor de transcripție, hormon, factor de creștere, receptor sau enzimă.** De exemplu, legarea optimă a prolactinei sau hormonului de crestere de receptorii lor specifici de pe membrana celulelor din țesuturile țintă este esențială pentru ca semnalul sa fie transmis mai departe și cu intensitatea dorită la promotorii genelor a caror activitate expresională este coordonată de aceștia. Orice modificare a compoziției în aminoacizi a acestor hormoni și mai ales a receptorilor lor face ca interacțiunea lor sa fie defectuoasă sau din contră mai bună, ceea ce se repercutează în final asupra capacității lactogene a glandei mamare.

Un alt exemplu concludent este cel al enzimei DGAT1, enzimă cheie implicată în sinteza grăsimilor în glanda mamară. Dubla substituție din exonul 8 de tip AA/GC, care are ca efect substituția unei lizine (K) cu o alanină (A) în proteina matură, face ca proteina care conține lizină să aiba o activitate enzimatică mai mare decât cea care conține alanină. Acest lucru are un efect marcant asupra procentului de grăsime din lapte (Winter și colab., 2002, Spelman și colab., 2002; Weler și colab., 2003; Grisard și colab., 2002; Sanders și colab., 2006; Gautier și colab., 2007; Näslund și colab., 2008).

Analizând rezultatele obținute în cadrul acestui proiect și datele din literatură, putem concluziona că prezența unei alele favorabile la un anumit locus nu înseamnă neaparat producție mai bună de lapte din punct de vedere cantitativ și calitativ, deoarece dacă o alelă favorabilă de la un locus este însoțită de prezența unor alele nefavorabile la ceilalți loci efectul fenotipic nu este cel așteptat.

Prin urmare, ameliorarea continuă a producției de lapte (și nu numai) se bazează pe îmbunătățirea continuă a combinațiilor alelice favorabile din genofondul indivizilor la locii care contribuie la dezvoltarea glandei mamare și a capacității ei lactogene, alele care sunt moștenite de la parinți.

În schemele clasice de ameliorare creșterea potențialului productiv al speciilor de fermă, în particular al producției cantitative și calitative de lapte, se face prin testarea taurilor în principal după descendenți. În urma testării pe criterii fenotipice sunt favorizați la reproducție indivizi cu potențialul ameliorator cel mai ridicat. În acest mod, în mod indirect, sunt favorizați la reproducție indivizi care poartă alele favorabile la locii implicați în dezvoltarea și capacitatea lactogenă a glandei mamare, cei mai importanți dintre aceștia fiind studiați în cadrul proiectului.

Accelerarea câstigului genetic poate fi realizată prin folosirea în schemele clasice de ameliorare a informațiilor furnizate de către markerii genetici. Acest lucru poate fi facut printr-o genotipizare precoce multilocus a indivizilor potențiali a fi utilizați ca reproducători, genotipizare care poate fi realizată la costuri relativ reduse pentru cele 10 gene cheie studiate (care sunt actorii principali ce controlează dezvoltarea și funcționarea glandei mamare) și prin metodologia de lucru propusă. O altă modalitate este genotipizarea indivizilor de interes prin tehnici de secvențiere completă a genomului sau prin intermediul cipurilor ADN, tehnici care sunt mult mai costisitoare și care se justifică din punct de vedere economic doar pentru indivizi extrem de valoroși. Genotipzarea precoce a taurilor pentru caractere de importanță economică, înainte de introducerea lor în programul clasic de testare pe criterii fenotipice, este deja o practică curentă în multe țari.

Investigarea combinaților alelice de la cei 10 loci cheie la rase de taurine ameliorate (BNR) versus rase rustice (SS), ne-a ajutat să înțelegem și să

explicăm mai bine determinismul genetic care stă la baza capacității lactogene diferențiate a glandei mamare la cele două rase de taurine, rase aflate la extreme în ceea ce privește gradul de dezvoltare al glandei mamare și capacitatea ei lactogenă. Acest lucru va deschide posibilitatea unei estimări mai precoce a potențialului productiv al taurinelor pentru acest caracter.

# CONCLUZII

1. Cercetările realizate în cadrul proiectului 113/2010-2013 au avut ca scop studierea polimorfismelor genetice a 10 gene cheie implicate în dezvoltarea, funcționarea glandei mamare și capacitatea ei lactogenă la taurine și anume genele care codifică: factorul de creștere pituitar (PIT1), hormonului de creștere (GH), prolactina (PRL), factorul de creștere insulin-like 1(IGF1), receptorul pentru prolactină (PRLR), receptorul pentru hormonul de creștere (GHR), factorul 5 de transmitere a semnalului și activare a transcripției (STAT5A), acilCoA diacilglicerol aciltransferaza 1 (DGAT1), ß1,4 galactoziltransferaza (GALT) și alfa-lactoalbumina (LALBA);
2. Acest studiu a fost realizat cu scopul de a identifica posibile polimorfisme (mutații) în structura acestor gene cheie care ar putea explica variabilitea mare privind gradul de dezvoltare al glandei mamare și al producției cantitative și calitative de lapte, variabiliate întâlnită la două rase de taurine aflate la extreme în ceea ce privește aceste caractere;
3. Studiul a fost realizat trei loturi de indivizi și anume:
   - ➢ două loturi de indivizi din rasa Balțată cu Negru Românească (Holstein Friză), unul alcătuit din indivizi cu o glandă mamară bine dezvoltată și cu o producție foarte mare de lapte de peste 10000l/lactație (lotul BNR-M) și unul alcătuit din indivizii cu o glandă mamară mai slab dezvoltată și cu o producție mai mica de lapte de sub 6000l/lactație (lotul BNR-S)
   - ➢ un lot de indivizi din rasa Sura de Stepă, varietatea Moldovenească (lotul SS), rasă ancestrală cu o glandă mamară foarte slab dezvoltată și cu o producție foarte mica de lapte de 1000-1500l/lactație;
4. În cadrul studiului au fost stabilite protocoale de extracție și de purificare ale ADN-ului total din sânge și ale ARN-ului total din celulele epiteliale secretoare ale glandei mamare recuperate din lapte;

5. Pentru studiul de secvențiere a regiunilor codificatoare ale celor 10 gene luate în studiu au fost folosite două strategii de evidențiere a polimorfismelor genetice:
   - în cazul celor trei gene care nu se exprimă în glanda mamară (PIT1, GH și PRL) au fost amplificate din probe de ADN extrase din sânge și secvențiate regiunile exonice și o parte din regiunile intronice flancatoare, folosind mai multe seturi de primeri specifici;
   - în cazul restului de șapte gene exprimate în glanda mamară în lactație (IGF1, PRLR, GHR, STAT5A, DGAT1, GALT și LALBA), probele de ARNm extrase din celulele epiteliale secretoare din lapte au fost supuse reverstranscripției, iar cADN-urile monocatenare obținute au fost apoi amplificate și secvențiate folosind unul sau mai multe seturi de primeri specifici în funcție de mărimea transcriptului;
6. Prin secvențiere au fost evidențiate o serie de mutații care caracterizează alelele prezente la fiecare locus și prin care indivizii din cele trei loturi se diferențiază. Pe baza mutațiilor evidențiate au fost stabilite protocoale de genotipizare, care au fost ulterior folosite pentru genotipizarea unui numar mare de indivizi din cele două rase de taurine;
7. Testarea genetică a fost realizată prin tehnica PCR-RFLP și a avut la bază o parte din mutațiile evidențiate prin secvențierea celor 10 gene, unele dintre acestea fiind evidențiate și în studii realizate pe alte rase taurine și care au fost asociate cu cantitatea și calitatea laptelui (menționate în Capitolul 1). În urma centralizării datelor experimentale de genotipizare realizată pe 180 de indivizi (câte 60 pe fiecare lot) a fost stabilită structura genetică în cele trei loturi prin calcularea frecvențelor alelelor și genotipurilor la locii studiați;
8. Prin secvențiere și genotipizare au fost observate polimorfisme alelice care diferențiază cele trei loturi de taurine, polimorfisme care pot explica în parte

diferențele fenotipice observate privind gradul de dezvoltare al glandei mamare, ceea ce are implicații importante asupra producției cantitative și calitative de lapte;

9. Combinațiile alelice evidențiate la cei 10 loci au variat în cadrul aceluiași lot, deși fenotipic au fost aleși indivizi omogeni în ceea ce privește gradului de dezvoltare al glandei mamare și al producției cantitative și calitative de lapte. Acest lucru sugerează ca toate din aceste combinații alelice evidențiate pot contribui la efectul fenotipic observat;
10. Combinațiile alelice evidențiate la cei 10 loci au variat mult mai frecvent între cele trei loturi de indivizi diferențiate marcant și din punct de vedere fenotipic. Această variabilitate alelică (genetică) ar putea explica variabilitea fenotipică constatată la indivizii din cele două rase de taurine studiate în ceea ce privește gradul de dezvoltare al glandei mamare și capacitatea ei lactogenă, ceea ce are implicații directe asupra producției cantitative și calitative de lapte.
11. Analizând rezultatele obținute în cadrul acestui proiect și datele din literatură, putem concluzioná că prezența unei alele favorabile la un anumit locus nu înseamna neaparat producție mai bună de lapte din punct de vedere cantitativ și calitativ, deoarece dacă o alelă favorabilă de la un locus este însoțită de prezența unor alele nefavorabile ceilalți loci efectul fenotipic nu este cel așteptat. Astfel la lotul SS au fost întâlnite o serie de alele anestrale (sălbatice) care concură la o mai slabă dezvoltare a glandei mamare și prin urmare la o producție cantitativă mai mica de lapte, dar de calitate net superioară;
12. Pentru ca efectul productiv sa fie cel dorit ameliorarea continuă a producției de lapte (și nu numai) se bazează pe îmbunătățirea continuă prin selecție a combinațiilor alelice favorabile din genofondul individului. Accelerarea câștigului genetic la taurine nu poate fi făcută decat printr-o genotipizare

multilocus și prin metodologia de lucru propusă sau prin tehnici de screening complet al genomului care sunt mult mai costisitoare și care se justifică din punct de vedere economic doar pentru indivizi extrem de valoroși;

13. Investigarea combinaților alelice de la cei 10 loci cheie la rase de taurine ameliorate (BNR) versus rase rustice (SS) ne-a ajutat să înțelegem și să explicăm mai bine determinismul genetic care stă la baza capacității lactogene diferențiate a glandei mamare la cele două rase de taurine, rase aflate la extreme în ceea ce privește gradul de dezvoltare al glandei mamare și capacitatea ei lactogenă. Acest lucru va deschide posibilitatea unei estimări mai precoce a potențialului productiv al taurinelor pentru acest caracter.
14. Adresa web a proiectului este: http://www.usamvcluj.ro/PNII_TE_113, iar cea de e-mail: lzga.usamvcj@yahoo.com.

## Bibliografie

1. Argetsinger LS, Carter Su C (1996). Growth hormone signaling mechanisms: involvement of the tyrosine kinase JAK2. Horm Res 45: 22-24
2. Arranz JJ, Coppieters W, Berzi P, Cambisano N, Grisart B, Karim L, Marcq F, Moreau L, Mezer C, Riquet J, Simon P, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Georges M (1998). A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: a confirmation. Anim Genet 29: 107-115
3. Balteanu VA, Carsai TC, Vlaic A (2013). Identification of an intronic regulatory mutation at the buffalo αS1-casein gene that triggers the skipping of exon 6. Mol Biol Rep 40 (7): 4311-4316
4. Balteanu VA (2010a). The study of major milk proteins genetic polymorphisms in the main cattle, buffalo, sheep and goat breeds from Romania with the aim of using them as genetic markers in breeding and traceability. PhD thesis, University of Agriculture Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca, Romania
5. Balteanu VA, Vlaic A, Suteu M, Carsai TC (2010b). A comparative study of major milk protein polymorphism in six Romanian cattle breeds. Bulletin of USAMV-CN, Anim Sci and Biotech 67: 345-350
6. Barendse W, Vaiman D Kemp SJ, Sugimoto Y, Armitage SM, Williams JL, Sun HS, Eggen A, Agaba M, Aleyasin, SA și colab. (1997). A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. Mamm Genome 8: 21-28
7. Bishop MD, Tavakkol A, Threadgill W, Simmen FA, Simmen RCM, Davis ME, Womack JE (1991). Somatic cell mapping and restriction fragment length polymorphism analysis of bovine insulin-like growth factor. J Anim Sci 69: 4306-4311

8. Blott S, Kim JJ, Moisio S, Schmidt-Kuntzel A, Cornet A, Berzi P, Cambisano N, Ford C, Grisart B, Johnson D, Karim L, Simon P, Snell R, Spelman R, Wong J, Vilkki J, Georges M, Farnir F, Coppieters W (2003). Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. Genetics 163: 253-266
9. Brym P, Kamiñski S, Wójcik E (2005a). Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits. J Appl Genet 45: 179-185
10. Brym P, Kamiński S, Wójcik E (2005b). Polymorphism within the bovine prolactin receptor gene (PRLR). Anim Sci Pap Rep 23: 61-66
11. Brym P, Kaminski S, Rusc´ A (2004). New SSCP polymorphism within bovine STAT5A gene and its associations with milk performance traits in Black-and-White and Jersey cattle. J Appl Genet 45(4): 445-452
12. Bona G, Paracchini R, Giordano M, Momigliano-Richiardi P (2004). Genetic defects in GH synthesis and secretion. Eur J Endocrinol 151 Suppl 1: S3-S9
13. Carsai TC, Balteanu VA, Cosier V, Vlaic A (2013a). Polymorphism within prolactin receptor (PrlR) gene in Romanian Black and White and Romanian Grey Steppe cattle breeds. Bulletin of USAMV-CN, Anim. Sci. and Biotech. 70
14. Carsai TC, Balteanu VA, Vlaic A, Chakirou K (2013b). Polymorphism within growth hormone receptor (GHR) gene in Romanian Black and White and Romanian Grey Steppe cattle breeds. ABAH Bioflux 5: 1-5
15. Carsai TC, Balteanu VA, Vlaic A, Cosier V (2012). The Polymorphism of Pituitary Factor 1 (POU1F1) in Cattle, Scientific Papers: Anim. Sci. and Biotech. USAMV BT 45: 142-146

16. Carsai TC, Balteanu VA, Vlaic A, Chakirou O (2011a). The study of growth hormone *Alu*I polymorphism in two Romanian cattle breeds. Bulletin of USAMV-CN, Anim. Sci. and Biotech. 68: 108-113
17. Carsai TC, Balteanu VA, Vlaic A (2011b). The study of Prolactin *Rsa*I Polymorphism in Romanian Grey Steppe Cattle Breed. Bulletin of USAMV-CN, Anim. Sci. and Biotech. 68: 417
18. Carsai TC, Balteanu VA (2010a). Key genes involved in development and lactation capacity of mammary gland in cattle and goats. Bulletin of USAMV-CN, Anim. Sci. and Biotech. 67: 480
19. Carsai TC, Balteanu V A (2010b). The polymorphism of some key genes involved in some lactation traits. Scientific Papers, Faculty of Animal Science Bucuresti, Animal Science LIII: 45-49
20. Chrenek P, Huba J, Oravcova M, Hetenyi L, Peskovieova D, Bulla J (1999). Genotypes of bGH and bPRL genes in relationships to milk production. Proceeding of the 50th Annual Meeting of the EAAP Zuerich, Book of Abstracts PP 40
21. Chung ER, Rhim TJ, Han SK (1996). Association PCR-RFLP markers of growth hormone and prolactin genes and production traits in diary cattle. Korean J Ani Sci 38: 321-336
22. Coppieters W, Riquet J, Arranz JJ, Berzi P, Cambisano N, Grisart B, Karim L, Marcq F, Moreau L, Nezer C, Simon P, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Georges M (1998). A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. Mamm Genome 9: 540-544
23. Darnell JE, JR (1997). STATs and gene regulation. Science 277: 1630-1635
24. Dybus A, Grzesiak W, Kamieniecki H, Szatkowska I, Sobek Z, Błaszczyk P, Piątkowska EC, Zych S, Muszyńska M (2005). Association of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle. Arch Tierz 48: 149-156

25. Dybus A, Szatkowska I, Czerniawska-Piątkowska E, Grzesiak W, Wójcik J, Rzewucka E, Zych S (2004). PIT1-*Hinf*I gene polymorphism and its associations with milk production traits in Polish Black and White cattle. Archiv Tierzucht 47: 557-563
26. Dybus A (2002) Associations of growth hormone GH and prolactin PRL genes polymorphism with milk production traits in Polish Black and White cattle. Anim Sci Pap Rep 20: 203-212
27. Flisikowski K, Strzałkowska N, Słoniewski K, Krzyzewki J, Zwierzchowski L (2004). Association of a sequence nucleotide polymorphism in exon 16 of the STAT5A gene with milk production traits in Polish Black-and-White (Polish Friesian) cows. Anim Sci Pap Rep 22: 515-522
28. Gautier M, Capitan A, Fritz S, Eggen A, Boichard D, Druet T (2007). Characterization of the DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. J Dairy Sci 90: 2980-2988;
29. Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen RCM (2001). Associations of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-1 concentration and growth traits in Angus cattle. J Anim Sci 79: 1757-1762
30. Grisart B, Farnir F, Karim L, Cambisano N, Kim JJ, Kvasz A, Mni M, Simon P, Frere JM, Coppieters W, Georges M (2004). Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. Proc Natl Acad Sci USA 101: 2398-2403
31. Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, Snell R (2002). Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. Genome Res 12: 222-231

32. Ghasemi N, Zadehrahmani M, Rahimi G, Hafezian SH (2009). Associations between prolactin gene polymorphism and milk production in Montebeliard cows. Int J Genet Mol Biol 1: 48-51
33. Georges M, Nielsen D, Mackinnon M (1995). Mapping quantitative trait loci controlling milk production by exploiting progeny testing. Genetics 139: 907-920
34. Hallerman EM, Theilmann JL, Beckmann JS, Soller M, Womack JE (1988). Mapping of bovine prolactin and rhodopsin genes in hybrid somatic cells. Anim Genet 19: 123-131
35. Yardibi H, Hosturk GT, Paya I, Kaygisiz F, Ciftioglu G, Mengi A, Oztabak K (2009). Associations of growth hormone gene polymorphisms with milk production traits in South Anatolian and East Anatolian Red Cattle. J Anim Vet Adv 8: 1040-1044
36. Hediger R, Johnson SE, Barendse W, Drinkwater RD, Moore SS, Hetzel J (1990). Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-qter in cattle and to 11q25-qter in sheep by in situ hybridization. Genomics 8: 171-174
37. Herrington J, Carter-Su C (2001). Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. Trends Endocrinol Metab 12:252-257
38. Huang W, Maltecca C, Khatib H (2008). A proline-to-histidine mutation in POU1F1 is associated with production traits in dairy cattle. Anim Genet 39: 554 - 557
39. Hoj S, Fredholm M, Larsen NJ, Nielsen VH (1993). Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. Anim Genet 24: 91-96
40. Kaupe B, Winter A, Fries R, Erhardt G (2004). DGAT1 polymorphism in Bos indicus and Bos taurus cattle breeds. J Dairy Res 71: 182-187

41. Kuhn C, Thaller G, Winter A, Bininda-Emonds OR, Kaupe B, Erhardt G, Bennewitz J, Schwerin M, Fries R (2004). Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. Genetics 167: 1873-1881
42. Lee BK, Lin GF, Crooker BA, Murtaugh MP, Hansen LB, Chester-Jones H (1993). Association of somatotropin (bST) gene polymorphism with selection for milk yield in Holstein cows. J Dairy Sci 76: 149
43. Le Provost F, Leroux C, Martin P, Gafe P, Dijane J (1994). Prolactin gene expression in ovine and caprine mammary gland. Neuroendocrinology 60: 305-313
44. Lewin HA, Schmitt K, Hubert R, Van Eijk MJ, Arnheim N (1992). Close linkage between bovine Prolactin and BoLADRB3 genes: genetic mapping in cattle by single sperm typing. Genomics 13: 44-48
45. Lucy MC, Hauser SD, Eppard PJ, Krivi GG, Clark JH, Bauman DE, Collier RJ (1993). Variants of somatotropin in cattle: Gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. Domest Anim Endocrin 10: 325-333
46. Lucy MC, Hauser SD, Eppard PJ, Krivi GG, Collier RJ (1991). Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by polymerase chain reaction and endonuclease digestion. J Dairy Sci 74: 284
47. Mattos KK, Del Lama SN, Martinez, Freitas AF (2004). Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls. Pesq Agropec Bras 39:147-150
48. Mehmannavaz Y, Amirinia C, Bonyadi M, Vaez Torshizi R (2010). Association of IGF-1 gene polymorphism with milk production traits and paternal genetic trends in Iranian Holstein bulls. Afr J Microbiol Res, 4: 110-114

49. Miceikienė I, Pečiulaitienė N, Baltrėnaitė L, Skinkytė R, Indriulytė R (2006). Association of cattle genetic markers with performance traits. Biologija 1: 24-29
50. Mitra A, Schlee P, Balakrishnan CR, Pirchner F (1995). Polymorphisms at growth hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. J Anim Breed Genet 112: 71-74
51. Moody DE, Pomp D, Barendse W (1995). Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine Pit1 gene and assignment of Pit1 to bovine chromosome 1. Anim Genet 26: 45-47
52. Molenaar A, Wheeler TT, McCracken JY, Seyfert HM (2000). The STAT3 encoding gene resides within the 40 kbp gap between the STAT5A- and STAT5B encoding genes in cattle. Anim Genet 31: 333-346.
53. Näslund J, Fikse WF, Pielberg GR, Lundén A (2008). Frequency and effect of the bovine acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism in Swedish dairy cattle. J Dairy Sci 91: 2127-2134
54. Oshima S, Barreras A (2003). Relationships between DGAT1 and Pit-1 genes polymorphism and milk yield in Holstein cattle. J Anim Sci 54: 1-3
55. Pareek SCH, Czarnik U, Zabolewicz T, Pareek SR, Walawski K (2005). DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide polymorphism in Polish Black and White cattle. J Appl Genet 46: 85-87
56. Plath-Gabler A, Gabler C, Sinowatz F, Berisha B, Schams D. (2001). The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland. Endocrinology 168: 39-48
57. Radovick S, Nations M, Du Y, Berg LA, Weintraub BD, Wondisford FE (1992). A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. Science 257: 1115-1118

58. Ramakrishnan B, Boeggeman E, Qasba PK (2002). β1,4-Galactosyltransferase and lactose synthase: molecular mechanical devices. Biochem Biophys Res Commun 291:1113-1118
59. Renaville R, Gengler N, Vrech E, Prandi A, Massart S, Corradini C, Bertozzi C, Mortiaux F, Burny A, Portetelle D (1997). Pit-1 gene polymorphism, milk yield and conformation traits for Italian Holstein - Friesian bulls. J Dairy Sci 80: 3431-3438
60. Riquet J, Coppieters W, Cambisano N, Arranz JJ, Berzi P, Davis S, Grisart B, Farnir F, Karim L, Mni M, Simon P, Taylor JF, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Womack JE, Georges M (1999). Identity-by-decent fine-mapping of QTL in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9252-9257.
61. Russo RN, Shaper NL, Shaper JH (1990). Bovine β1, 4-galactosyltransferase: two sets of mRNA transcripts encode two forms of the protein with different amino-terminal domains: In vitro translation experiments demonstrate that both the short and the long forms of the enzyme are type II membrane-bound glycoproteins. J Biol Chem 265: 3324-3331
62. Sabour, MP, Lin CY, Smith C (1997). Association of genetics variants of bovine growth hormone with milk production traits in Holstein cattle. J Anim Breed Genet 114: 435-442
63. Sadeghi M, Moradi Shahrbabak M, Rahimi Mianji G, Nejati Javaremi A (2009). Polymorphism at locus of STAT5A and its association with breeding values of milk production traits in Iranian Holstein bulls. Livest Sci 123: 97-100
64. Sanders K, Bennewitz J, Reinsch N, Thaller G, Prinzenberg EM, Kuhn C, Kalm E (2006). Characterization of the DGAT1 mutations and the CSN1S1 promoter in the German Angeln dairy cattle population. J Dairy Sci 89:

3164-3174

65. Schlee P, Graml R, Rottmann O, Pirchner F (1994). Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. J Anim Breed Genet 111: 253-256
66. Selvaggi M, Dario C, Normanno G, Celano GV, Dario M (2009). Genetic polymorphism of STAT5A protein: relationships with production traits and milk composition in Italian Brown cattle. J Dairy Res: 76: 441- 445
67. Shaper NL, Charron M, Lo NW, Shaper JH (1998). β 1,4-Galactosyltransferase and lactose biosynthesis: recruitment of a housekeeping gene from the nonmammalian vertebrate gene pool for a mammary gland specific function. J Mammary Gland Biol Neoplasia 3: 315-324
68. Siadkowska E, Zwierzchowski L, Oprzadek J, Strzałkowska N, Bagnicka E, Krzyaewski J (2006). Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. Anim Sci Pap Rep 24: 225-237
69. Soulier S, Mercier JC, Vilotte JL, Anderson J, Clark AJ, Provot C (1989). The bovine and ovine genomes contain multiple sequences homologous to the alpha-lactalbumin-encoding gene. Gene 83: 331-338.
70. Spelman RJ, Ford CA, McElhinney P, Gregory GC, Snell RG (2002). Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. J Dairy Sci 85: 3514-3517
71. Sun D, Jia J, Ma Y, Zhang Y, Wang Y, Yu Y, Zhang Y (2009). Effects of DGAT1 and GHR on milk yield and milk composition in the Chinese dairy population. Anim Genet 40: 997-1000
72. Seyfert H, Pitra C, Meyer L, Brunner RM, Wheeler TT, Molenaar A, McCracken JY, Herrmann J, Thiesen H, Schwerin M (2000). Molecular characterization of STAT5A and STAT5B encoding genes reveals extended intragenic sequence homogeneity in cattle and mouse and different degrees

of divergent evolution of various domains. J Mol Evol 50: 550-561

73. Stinnakre MG, Vilotte JL, Soulier S, Mercier JC (1994). Creation and phenotypic analysis of a-lactalbumin deficient mice. Proc Natl Acad Sci 91: 6544-6548
74. Viitala S, Szyda J, Blott S, Schulman N, Lidauer M, Maki-Tanila A, Georges M, Vilkki J (2006). The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. Genetics 173: 2151-2164
75. Vilotte JL, Soulier S, Mercier JC, Gaye P, Hue-Delahaie D, Furet JP (1987). Complete nucleotide sequence of bovine α-lactalbumin gene. Comparison with its rat counterpart. Biochem 69: 609-620
76. Yang J, Zhao B, Baracos VE, Kennelly JJ (2005). Effects of bovine somatotropin on beta-casein mRNA levels in mammary tissue of lactating cows. J Dairy Sci 88: 2806-2812
77. Zakizadeh S, Reissmann M, Rahimi G, Nejati Javaremi A, Reinecke P, Mirae-Ashtiani SR, Morandi Shahrbabak M (2007). Polymorphism of bovine POU1F1 gene: allele frequencies and effects on milk production in three Iranian native breeds and Holstein cattle of Iran. Pak J Biol Sci 10: 2575-2578
78. Zhang HM, Maddock KC, Brown DR, Denise SK, Ax RL (1993). A novel allele of the bovine somatotropin gene detected by PCR-RFLP analysis. J Anim Sci 71: 2276
79. Zhou Y, Akers RM, Jiang H (2008). Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells. J Dairy Sci 91: 100-108
80. Zwierzchowski L, Krzyżewski J, Strzałkowska N, Siadkowska E, Ryniewicz Z (2002). Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk

yield and composition of Polish Black and White cows. Anim Sci Pap Rep 20: 213-227

81. Wakao H, Gouilleux F, Groner B (1994). Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. EMBO J 13: 2182-2191
82. Weller JI, Golik M, Seroussi E, Ezra E, Ron M (2003). Population wide analysis of a QTL affecting milk fat production in the Israeli Holstein population. J Dairy Sci 86: 2219-2227
83. Winter A, Kramer W, Werner FA, Kollers S, Kata S, Durstewitz G, Buitkamp J, Womack JE, Thaller G, Fries R (2002). Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. Proc Natl Acad Sci USA 99: 9300-9305
84. Woollard J, Schmitz CB, Freeman AE, Tuggle CK (1994). *Hinf*I polymorphism at the bovine PIT1 locus. J Anim Sci 72:3267
85. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
86. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blastcgi
87. http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
88. http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedithtml
89. http://tools.neb.com/ NEBcutter2.