MINISTERUL AGRICULTURII ŞI DEZVOLTĂRII RURALE

PLANUL SECTORIAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE 2023-2026

TITLUL PROIECTULUI ADER 714

Cercetări cu privire la evaluarea gradului de diferențiere genetică între ecotipurile de ovine din cadrul rasei Turcana (Bălă, Creață, Oacheșă, Bucălaie, Brează etc) si alte rase / ecotipuri autohtone de ovine (Tigaie, Ratca etc) prin metode de analiză genomică

Raport de cercetare al FAZEI II

Evaluarea gradului de diferențiere genetică intre rasele / ecotipurile de ovine studiate pe baza unor markeri autozomali

Perioada de derulare a FAZEI II: 01.10.2023-31.03.2025

Conducător proiect: SCDCOC CARANSEBEȘ

Partener 1: USAMV CLUJ-NAPOCA

SCDCOC CARANSEBEȘ

1. Evaluarea gradului de diferentiere genetica dintre ecotipurile rasei Țurcană (ex. Bălă, Oacheșă, Bucălaie, Breazăsi Creață) si intre rasele Țurcană, Rața si Țigaie pe baza unor markeri ADN autozomali de tip SNP

Scopul cercetarilor efectuate a fost evaluarea gradului de diferentiere genetica dintre ecotipurile de ovine din cadrul rasei Țurcană ex. Bălă, Oacheșă, Bucălaie, Breazăși Creață de Caransebeș, respectiv alte rase de ovine (Țigaie Ruginie si Rața etc) pe baza unor markeri autozomali de tip SNP (Figura 1).



Figura 1. Ovine reprezentative din rasele Țurcană, ecotipurile Bălă, Bucălaie, Breazăă, Creață de Caransebeș, rasa Țigaie Ruginie și rasa Rața inlcuse in studiul genomic

Procedura de genotipare prin tehnica DNA microarray și analiza datelor

- Pentru genotiparea a fost folosit un array care permite analiza simultana la fiecare individ a peste 50.000 de mutatii de tip SNP din genom;
- Analiza bioinformatica a datelor de genotipare SNP a fost realizata cu ajutorul unor programe bioinformatice specifice.

Rezultate obtinute

- Indicele de diferentiere genetica (*Fst*), care exprima distanta genetica dintre ecotipurile sau rasele analizate, a fost calculat pe baza datelor de genotipare SNP (Tabelul 1)

Rasa / var.	Țurcană Bă	Țurcană Oa	Țurcană Bu	Creață Cs	Țurcană Br
Țurcană Bă	0.000	0.034	0.071	0.053	0.109
Țurcană Oa	0.034	0.000	0.040	0.026	0.050
Țurcană Bu	0.071	0.040	0.000	0.060	0.076
Creață Cs	0.053	0.026	0.060	0.000	0.066
Țurcană Br	0.109	0.050	0.076	0.066	0.000

Tabelul 1. Indici de diferentiere genetica (*Fst*) dintre ecotipurile rasei Țurcană, ex. Bălă, Oacheșă, Bucălaie, Breazăși Creață de Caransebeș calculati pe baza datelor de genotipare SNP

- Cea mai mica diferentiere genetica a fost observata intre ecotipurile Bălă și Oacheșă, in concordanta cu originea comuna a celor doua ecotipuri.
- O diferentiere mare s-a constatat intre ecotipurile Bălă și Bucălaie, respectiv Bălă și Breazăă, acest lucru fiind in concordanta cu diferentierea lor fenotipica datorata procesului lor diferit de formare.
- O diferentiere medie s-a constatat intre ecotipurile Bucălaie si Breazăă, ceea se poate explica prin faptul prezinta un fond de gene comun, fiind formate in acelasi areal geografic.

- Analiza semnificatiei valorilor obtinute in cazul indicelui *Fst* (Tabelul 2) a indicat o difentiere mai mare sau mai mica intre ecotipurile din cadrul rasei Țurcană și rasa Rațca (var. alba și neagra).

Rasa / var.	Țurcană Bă	Țurcană Oa	Țurcană Bu	Creață Cs	Țurcană Br	Rațca albă	Rațca neagră	Tigaie Ruginie1	Tigaie Ruginie2
Țurcană Bă	0.000	0.034	0.071	0.053	0.109	0.087	0.085	0.091	0.058
Țurcană Oa	0.034	0.000	0.040	0.026	0.050	0.058	0.058	0.050	0.021
Țurcană Bu	0.071	0.040	0.000	0.060	0.076	0.077	0.076	0.075	0.054
Creață Cs	0.053	0.026	0.060	0.000	0.066	0.075	0.072	0.066	0.007
Țurcană Br	0.109	0.050	0.076	0.066	0.000	0.095	0.092	0.108	0.072
Rațca albă	0.087	0.058	0.077	0.075	0.095	0.000	0.027	0.090	0.071
Rațca neagră	0.085	0.058	0.076	0.072	0.092	0.027	0.000	0.087	0.065
Țigaie Ruginie1	0.091	0.050	0.075	0.066	0.108	0.090	0.087	0.000	0.054
Țigaie Ruginie2	0.058	0.021	0.054	0.007	0.072	0.071	0.065	0.054	0.000

Tabelul 2. Indici de diferentiere genetica (*Fst*) dintre rasele de ovine analizate ex. Țurcană, Rațca var. alba și neagra și Țigaie Ruginie calculati pe baza datelor de genotipare SNP

- Valorile indicelui Fst au indicat o diferentiere mare intre rasa Rațca (var. alba și neagra) și ecotipurile Bălă (Fst=0,085-0,087), respectiv Breazǎ (Fst=0,092-0,095), o diferentiere medie fata de ecotipurile Bucălaie (Fst=0,076-0,077) și Creață de Caransebeș (Fst=0,072-0,075), respectiv mai mica fata de ecotipul Oacheșă (Fst=0,058). Cele doua populatii de ovine din cadrul rasei Țigaie Ruginie se difentiaza semnificativ fata de ecotipurile Bălă și Breazǎ și mediu fata de celelalte ecotipuri. Rasa Tigaie Ruginie se diferentiaza semnificativ fata de rasa Rațca.

- Analiza componentelor principale (Figura 2), a evidentiat o diferentiere semnificativă intre rasa Rațca *vesus* rasele Țurcană și Țigaie Ruginie. Distantarea genetica a rasei Rațca fata de rasele Țurcană și Țigaie nu este suprinzatoare avand in vedere originea ei ancestrala.
- Rasele Țurcană și Țigaie Ruginie au grupat in clustere diferite, dar in apropiere una fata de alta, ceea ce evidentiaza un background genetic comun. In cadrul clusterului format de rasa Țurcană ecotipurile Bălă, Oacheșă, Breazăși Creață de Caransebeș au grupat foarte apropiat, ceea ce sugereaza existenta unui fondul de gene comun. Ecotipul Bucălaie a grupat la o anumita distanta fata de celelate ecotipuri din cadrul rasei Țurcană (Figura 2).

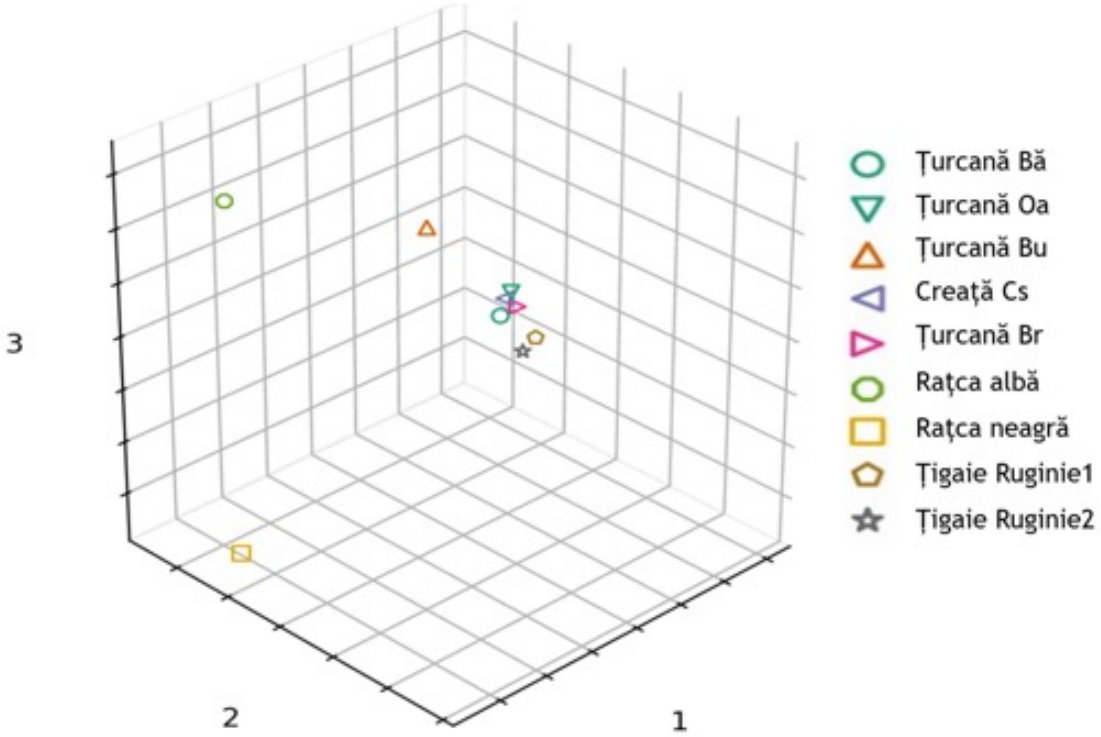


Figura 2. Diagrama MDS evidentiind relatiile genetice dintre ecotipurile din cadrul rasei Țurcană (Bălă, Oacheșă, Bucălaie, Breazăși Creață de Caransebeș) *versus* Rațca var. alba și neagra și Țigaie Ruginie

- Analiza comparativa a structurii genetice (admixture) a ecotipurilor din cadrul rasei Țurcană *versus* rasa Rațca, var. alba si neagra și rasa Țigaie Ruginie a fost realizata la diferite valori ale lui K (Figura 3).

- La K=2, se diferentiaza doua grupuri de ovine cu background genetic diferit, unul format din rasa Rațca var. alba și neagra, cel de-al doilea format din ecotipurile rasei Țurcană si rasa Țigaie Ruginie.

- La K=4, se observa o similaritate genetica dintre ecotipurile rasei Țurcană (Bălă, Oacheșă, Breazăă) și rasa Țigaie Ruginie. Heterogenitatea indivizilor din cadrul ecotipului Bucălaie este evidenta, deoarece ei provin din subpopulatii cu origini diferite din judetele Sibiu si Hunedoara. In cadrul rasei Rațca cele doua varietati de culoare se diferentiaza, chiar daca apartin aceleași rase.

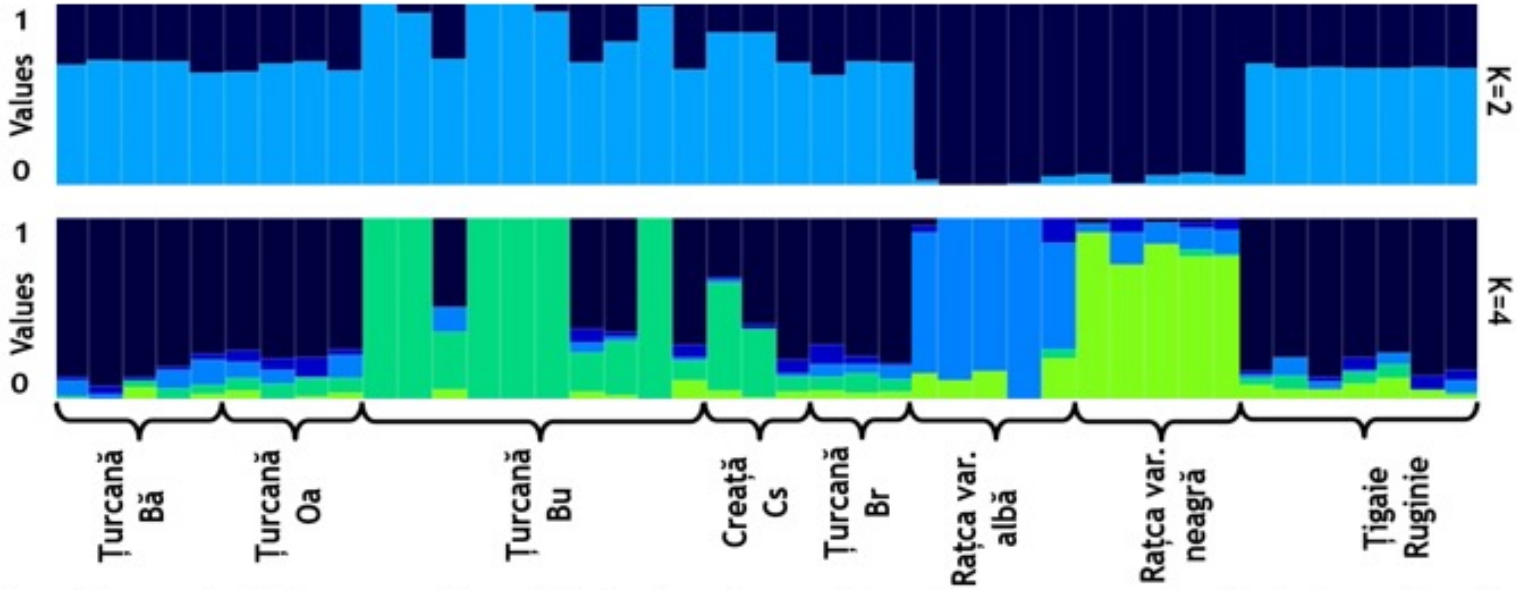


Figura 3. Analiza admixture evidentiind structura genetica a unor indivizi analizati din cadrul ecotipurilor rasei Țurcană ex. Bălă, Oacheșă, Bucălaie, Breazăă și Creață de Caransebeș *versus* Rațca var. alba și neagra și Țigaie Ruginie

CONCLUZII

- Analiza datelor genomice a evidentiat faptul ca ecotipurile Bălă, Oacheșă, Bucălaie si Breazăă din cadrul rasei Țurcană prezintă un anumit grad de diferentiere genetica;

- Cu toate acestea, populatiile din cadrul aceluiasi ecotip al rasei Țurcană (ex. Bucălaie, Bălă sau Breazăă) prezinta o heterogenitate destul de mare de la o populatie la alta, in functie de arealul geografic de origine. Acesta heterogenitate se datoreaza practicilor necontrolate de incrucisare intre ecotipuri;

- De exemplu, ecotipul Bucălaie din zona Luncani, Jud. Hunedoara se diferentiaza din punct de vedere genetic de Bucălaia formata in Jud. Sibiu, aspect confirmat si de diferentierea lor fenotipica;
- Ecotipul Bălă format in zona Șugag, jud. Alba se diferentiaza intr-o anumita proportie de populaiile din Judetele Bistrita sau Satu Mare, desi prezinta multe similaritati fenotipice;

- Pentru omolgarea ecotipurilor Bălă, Oacheșă, Bucălaie si Breazăă din cadrul rasei Țurcană ca rase distincte este absolut necesara analiza genomica a mii de indivizi din populatii diferite, in scopul identificarii si includerii in nucleele de selectie doar a indivizilor din rasa pura cu caracteristici morfo-productive si genetice specifice ecotipului respectiv si eliminarea celor necorespunzatori;

- Acest lucru poate fi facut in timp doar prin implementarea unui program de selectie riguros pe criterii morfo-productive si genomice si reproductia lor separata.

2. Testarea unei metodologii de genotipare pentru stabilirea filiatiei pe cateva familii de ovine din cadrul raselor studiate

Scopul cercetarilor a fost testarea unei metode pentru stabilirea a filiatiei pe cateva familii de ovine, pe baza unui panel informativ de markeri microsateliti.

Procedura de genotipare prin tehnica microsatelitilor si analiza datelor

- Testul genetic pentru stabilirea filiatiei la ovine constata in analiza polimorfismului genetic a unui panel de 13 - 22 de markeri microsateliti din genomul ovinelor, la descendenti si parintii prezumtivi si analiza bioinfomatica a datelor de genotipare pentru certificarea parintilor reali si excluderea celor care nu se califica.

Rezultate obtinute

- Analiza profilelor genetice rezultate prin separarea fragmentelor amplificate de la locii markerilor microsateliti de la fiecare individ din cadrul familiilor de ovine studiate, a evidentiat prezenta unor fragmente variabile ca marime, exprimate numeric in perechi de baze (Tabelul 3).

- In cazul Familiei 1 (F1), analiza comparativa a profilului ADN al microsatelitilor la miel-produs (3 Oa) și parintii prezumtivi 1 Oa (mama), respectiv 2 Oa (tata), a evidentiat faptul ca aceștia sunt parintii lui genetici (Tabelul 3).

Tabelul 3. Marimea alelelor și genotipurile obtinute la ovinele din rasa Țurcană analizate

Rasa	Nr proba	Sex	Familia	Animale	Exemplu de 5 microsateliți testați pentru stabilirea filiației (mărime alele în perechi de baze)										Compatibiltate părinți - produs
					CSRD247 alela 1	CSRD247 alela 2	D5S2 alela 1	D5S2 alela 2	HSC alela 1	HSC alela 2	INRA063 alela 1	INRA063 alela 2	MAF65 alela 1	MAF65 alela 2	
Țurcană	1 Oa	F	F1	mamă	213	213	192	192	275	275	169	169	127	131	DA
Țurcană	2 Oa	M		tată	247	257	190	200	273	295	169	175	127	129	DA
Țurcană	3 Oa	M		miel-produs	213	247	192	200	273	275	169	169	127	127	
Țurcană	4 Oa	F	F2	mamă	213	213	186	192	273	295	175	183	129	131	DA
Țurcană	5 Oa	M		tată	209	213	186	192	285	295	169	177	135	135	NU
Țurcană	6 Oa	M		miel-produs	213	223	192	192	273	285	177	183	123	129	
Țurcană	7 Oa	F	F3	mamă	213	227	192	196	263	295	169	169	127	127	NU
Țurcană	8 Oa	M		tată	213	223	186	192	277	285	175	175	127	135	NU
Țurcană	9 Oa	M		miel-produs	227	227	188	190	269	279	177	199	127	133	

- In cazul Familiei 2 (F2), analiza comparativa a profilului ADN al microsatelitilor la miel-produs (6 Oa) și parintii prezumtivi 4 Oa (mama), respectiv 5 Oa (tata), a evidentiat o compatibilitate de 100% a mielului cu mama prezumtiva, dar și o incompatibilitate genetica tatalui cu acesta.

- In cazul Familiei 3 (F3), analiza comparativa a profilului ADN al microsatelitilor la miel-produs (9 Oa) și a parintilor prezumtivi 7 Oa (mama), respectiv 8 Oa (tata), a evidentiat o incompatibilitate genetica a ambilor parinti (mama si tata) cu acesta.

CONCLUZII

- Metoda testata pentru stabilirea filiatiei la ovine bazata pe analiza unui panel de markeri ADN microsateliti, s-a dovedit foarte fiabila. Ea ar putea fi folosita cand fermierii au dubii privind paternitatea sau maternitatea unui anumit produs.

3. Genotiparea la locusul PRNP a unor ovine din rasele Țurcană si Rațca din ferma SCDCOC Caransebeș

Scopul cercetarilor efectuate a fost genotiparea la locusul PRNP unor berbeci din rasele Țurcană si Rațca in vederea selectarii si folosirii la monta a celor cu rezistenta crescuta la scrapie (Figura 4).



Figura 4. Procedura de recoltare a probelor de sange de la ovine pentru stabilirea genotipurilor la locusul PRNP

Procedura de genotipare a ovinelor la locusul PRNP

- Scrapia provoca pierderi economice majore. Metoda a de genotipare a constat in analiza prin secventiere a polimorfismului codonilor 136, 154 și 171 din gena PRNP, care au fost asociati cu rezistenta sau susceptibiltatea la scrapie a ovinelor;

- Ameliorare a rezistentei genetice a ovinelor la scrapie vizeza cresterea prin selectie a frecventei genotipurilor de tip ARR/ARR prin genotipare și promovarea lor la reproductie.

Rezultate obtinute

- La ambele rase analizate din efectivele statiunii au fost identificate cinci alele comune: ARR, ARH, AHQ, ARQ și VRQ. Pe baza datelor de genotipare au fost calculate frecventele genotipurilor la locusul PRNP la rasele analizate (Tabelul 4).

Tabelul 4. Date privind frecventele genotipurile de la locusul PRNP evidentiate la ovinele rasele Țurcană și Rațca var. alba și neagra

Clasa de risc	Genotipuri PRNP	Rasa Țurcană	Rasa Rațca var. albă și negră
Clasa 1	ARR/ARR	7.69	10.00
Clasa 2	ARR/ARQ, ARR/ARH, ARR/AHQ	38.46	50.00
Clasa 3	ARQ/ARQ, ARQ/ARH	38.46	40.00
Clasa 4	ARR/VRQ	0.00	0.00
Clasa 5	ARQ/VRQ	15.38	0.00

- La rasa Țurcană si Rațca genotipul din clasa 1 - ARR/ARR, asociat cu rezistenta crescuta la scrapie, au fost identificate cu o frecventa mica.

- Genotipurile din clasa 2 (ARR/ARQ, ARR/ARH si ARR/AHQ), asociate cu rezistenta medie la scrapie au avut o frecventa mai mare la rasa Rațca (50%) si sub 40 % la rasa Turcana.

- Genotipurile din Clasa 3 de risc (ARQ/ARQ, ARH/ARQ, ARQ/AHQ) avut o frecventa relativ apropiata la rasele Țurcana și Rațca.

- Genotipurile din clasa 4 de risc nu au fost identificate la animalele genotipate.

- Genotipurile de clasa 5 au fost identificate cu o frecventa mica doar la ovinele analizate din rasa Țurcană, la rasa Rața fiind absente.

CONCLUZII

- Ameliorare a rezistentei genetice a ovinelor la scrapie trebuie sa vizeze cresterea frecventei genotipurilor de tip ARR/ARR prin genotiparea și promovarea indivizilor din clasele 1 si 2 la reproductie.