

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

CERCETĂRI PRIVIND SELECȚIA REPRODUCĂTORILOR LA OVINE PENTRU REZISTENȚA LA SCRAPIE

Doctorand: PARASCHIVESCU Petruț Lucian

Conducător științific: Prof. univ. Dr. GROSU Horia

CUVINTE-CHEIE: *scrapie, proteină prionică, PCR, Real-Time PCR, secvențiere Sanger, caractere categoriale, model biometric cu prag (threshold)*

Principalul scop al prezentei cercetări a fost identificarea și evaluarea criteriilor genetice și fenotipice relevante pentru selecția eficientă a reproducătorilor care prezintă o rezistență crescută la scrapie. Studiul urmărește să contribuie la îmbunătățirea sănătății și rezistenței efectivelor de ovine prin reducerea prevalenței bolii, asigurând astfel creșterea productivității și durabilității populațiilor de ovine. Selecția reproducătorilor pentru rezistență la scrapie reprezintă o prioritate esențială pentru ameliorarea genetică și creșterea durabilă a efectivelor de ovine. Acest proces îmbunătățește sănătatea animalelor și contribuie la protejarea sănătății publice prin reducerea riscului de transmitere a bolii. Screpia este o boală neurodegenerativă fatală care afectează ovinele și caprinele, având un impact semnificativ asupra sănătății animalelor și asupra industriei zootehnice. În acest context, cercetarea s-a concentrat pe identificarea și evaluarea polimorfismelor proteinei prionice asociate cu rezistența sau susceptibilitatea la scrapie. Explorarea acestor polimorfisme a permis dezvoltarea unor strategii eficiente de selecție a reproducătorilor masculi, strategii care sperăm să asigure astfel viabilitatea pe termen lung a efectivelor.

Un alt obiectiv important al cercetării a fost reprezentat de dezvoltarea și implementarea unor strategii noi, eficiente pentru selecția reproducătorilor rezistenți la scrapie, prin crearea unui protocol eficient de selecție genetică bazat pe de-o parte pe analiza polimorfismelor identificate, dar care să poată fi aplicat în practică de către crescătorii de ovine. Lucrarea propune un protocol detaliat și practic pentru selecția reproducătorilor masculi pe baza polimorfismelor proteinei prionice, care poate fi implementat de crescătorii de ovine. Acest protocol folosește tehnici avansate de modelare statistică pentru a observa probabilitatea fecărui reproducător să dea descendenți rezistenți, mai exact utilizează modelul biometric cu prag, potențialul de a îmbunătăți semnificativ rezistența efectivelor la scrapie. Prin utilizarea modelului biometric cu prag, acest studiu abordează într-o manieră unică problema selecției reproducătorilor pentru rezistența la scrapie.

Prin integrarea rezultatelor obținute în contextul teoretic existent și prin aplicarea acestora în practică, studiul aduce o contribuție semnificativă la înțelegerea

mecanismelor genetice ale rezistenței la scrapie și pentru ameliorarea efectivelor de ovine. Aceste contribuții pot servi drept punct de plecare pentru cercetări ulterioare și pentru dezvoltarea unor soluții inovatoare în domeniul geneticii animale.

CAPITOLUL VI. ANALIZA POLIMORFISMELOR PROTEINEI PRIONICE ÎN CADRUL RASELOR DE OVINE CRESCUTE ÎN ROMÂNIA

În acest capitol studiul s-a canalizat pe identificarea și evaluarea polimorfismelor proteinei prionice (PRNP) asociate cu susceptibilitatea și rezistența la scrapie în rasele de ovine crescute în România. Analiza probelor din anii 2019 și 2020 a evidențiat că din cele 15 combinații posibile de alele, doar 13 au fost exprimate în fiecare an. Genotipurile homozigote ARH/ARH și heterozigote AHQ/ARH au lipsit în 2019, iar genotipurile heterozigote ARQ/ARH și ARQ/AHQ nu au fost prezente în 2020. Prezența constantă și ușor crescută a alelei homozigote ARR/ARR, de la 16.8% în 2019 la 17.98% în 2020, și abundența genotipului heterozigot ARR/ARQ (38.79% în 2019 și 40.30% în 2020) subliniază preferințele de reproducție pentru genotipurile rezistente la scrapie. Paraschivescu și col. (2023)

În cadrul populației de oi din rasa Karakul, analiza datelor a inclus, pe lângă genotipurile descendenților, greutatea la fătare și culoarea robei. Frecvența alelelor ARR, ARH, ARQ, VRQ și AHQ a fost prezentată, cu ARQ fiind cea mai răspândită, urmată de ARR și AHQ. Alela VRQ a avut o incidență foarte mică, subliniind necesitatea unei supravegheri sporite pentru a gestiona riscul de transmitere a scrapiei.

Metoda de secvențiere Sanger a fost utilizată pentru screeningul susceptibilității la scrapie, oferind o precizie ridicată în identificarea polimorfismelor specifice ale genei PRNP. Aceasta a facilitat selecția genetică și managementul efectivelor de ovine, contribuind la dezvoltarea unor strategii eficiente de ameliorare genetică.

Analiza frecvenței genotipurilor între 2019 și 2020 a arătat o stabilitate semnificativă, cu 13 din cele 15 combinații posibile de alele exprimate în fiecare an. Prezența constantă și ușor crescută a alelei homozigote ARR/ARR și predominanța genotipului heterozigot ARR/ARQ reflectă o tendință de prioritizare a genotipurilor cu rezistență ridicată la scrapie.

Alela ARQ, asociată cu sensibilitate minimă la scrapie, a fost cea mai răspândită, prezentă în 120 de apariții în populația studiată și cu 622 de indivizi purtători. În contrast, alelele asociate cu rezistență, precum ARR și AHQ, au fost prezente la frecvențe mai scăzute, subliniind diversitatea genetică existentă.

Alela VRQ a avut o incidență foarte mică, fiind observată la doar 4 indivizi. Acest aspect subliniază necesitatea unor eforturi sporite de supraveghere și monitorizare pentru a gestiona riscul de transmitere a scrapiei și pentru a implementa strategii de management proactive.

Metoda de secvențiere Sanger s-a dovedit a fi extrem de utilă în screeningul susceptibilității la scrapie, oferind o precizie ridicată în identificarea polimorfismelor specifice ale genei PRNP. Aceasta contribuie semnificativ la dezvoltarea unor strategii eficiente de ameliorare genetică și la reducerea incidenței scrapiei în populațiile de ovine.

Rezultatele acestui studiu sunt în concordanță cu cele raportate de Hrinca și col. (2014), care au asociat alela ARQ cu o sensibilitate minimă la scrapie. Predominanța acestei alele în populația de ovine din România sugerează un risc mic de transmitere a scrapiei, similar cu concluziile lor.

CAPITOLUL VII. CARACTERIZAREA FENOTIPICĂ A POPULAȚIEI STUDIAȚE

În acest capitol s-au explorat în detaliu caracteristicile fenotipice ale mai multor rase de ovine crescute în România, evaluând atât rezistența la scrapie, cât și alți parametri esențiali pentru sănătatea și productivitatea animalelor. Studiul a inclus analiza detaliată a raselor Țurcană, Țigaie, Merinos și Karakul.

Rasa Țurcană a prezentat o diversitate genetică remarcabilă, cu predominanța genotipurilor ARQ/ARQ (53.50%) și ARR/ARQ (37.85%). Genotipul ARQ/ARQ este asociat cu o susceptibilitate moderată la scrapie, în timp ce genotipul ARR/ARQ indică o rezistență mai mare. Caracteristicile fenotipice includ producția de lână (2.2 kg pentru oi și 3.2 kg pentru berbeci), producția de lapte (70-90 litri medie, cu un maxim de 235 litri), și sporul mediu zilnic (140-160 g/cap/zi).

Rasa Țigaie este caracterizată în principal de genotipurile ARQ/ARQ (50.65%) și ARR/ARQ (39.57%), sugerând o susceptibilitate moderată și, respectiv, o rezistență mai mare la scrapie. Fenotipic, Țigaia prezintă o greutate corporală la naștere de 3-4.5 kg și o greutate corporală adultă de 45-47 kg. Producția de lână este de 4-5 kg pentru oi și 6-8 kg pentru berbeci, iar producția totală de lapte este de 150-170 litri.

Rasa Merinos, cunoscută pentru producția sa excelentă de lână, are genotipurile predominante ARR/ARR (42.22%) și ARR/ARQ (45.81%), indicând o rezistență bună și moderată la scrapie. Fenotipic, producția de lână variază între 6-8 kg pentru oi și 12-14 kg pentru berbeci. Producția de lapte este de 130-160 litri, iar sporul mediu zilnic depășește 200 g.

Rasa Karakul se remarcă prin adaptabilitatea și robustețea sa. Distribuția alelelor în populația Karakul include ARR (1.7%), ARQ (88.6%), ARH (8.1%), și AHQ (1.6%). Greutatea corporală la fătare este de 4.47 kg, iar greutatea adulților variază între 40-45 kg pentru oi și 70-80 kg pentru berbeci. Producția de lână este de 1.8-2.5 kg. Predominanța alelei ARQ sugerează necesitatea unor intervenții genetice pentru a crește rezistența la scrapie.

Analiza genotipurilor între 2019 și 2020 a arătat o stabilitate considerabilă, cu o tendință de prioritizare a genotipurilor cu rezistență ridicată la scrapie, cum ar fi ARR/ARR și ARR/ARQ. Rasele studiate au prezentat o diversitate genetică moderată spre ridicată, cu predominanța alelelor ARQ și ARR, sugerând un potențial favorabil pentru ameliorarea genetică orientată spre rezistența la scrapie. Predominanța alelei ARQ în unele rase, cum ar fi Karakul, subliniază necesitatea unor programe de selecție genetică riguroasă pentru a reduce susceptibilitatea la scrapie.

Greutatea la fătare, producția de lână și producția de lapte sunt parametri fenotipici esențiali care reflectă sănătatea și viabilitatea populațiilor studiate, fiind relevante pentru strategii de management și selecție genetică.

CAPITOLUL VIII. ESTIMAREA PARAMETRILOR GENETICI PENTRU REZISTENȚA LA SCRAPIE

Analiza parametrilor genetici pentru rezistența la scrapie a relevat diferențe semnificative între diversele rase de ovine studiate, utilizând modelul liniar mixt emREML. Rasele Țurcană și Merinos au prezentat cele mai mari valori ale varianței aditive, indicând un potențial genetic considerabil pentru aceste rase în ceea ce privește rezistența la scrapie. Varianța reziduală a fost mai mare la rasele Țigaie și Cap Negru de Teleorman, iar varianța totală a fost cea mai mare la rasele Țurcană și Merinos, reflectând o variabilitate generală ridicată în aceste populații.

Rasele Țurcană și Merinos au avut cele mai mari valori ale heritabilității (0.925 și 0.801, respectiv), sugerând că scrapia are un determinism genetic care variază de la intens heritabil în aceste rase. În contrast valorile mai mici ale heritabilității la rasele Awassi (0.194) și Ille de France (0.31) indică un determinism genetic slab în aceste rase.

Distribuția alelelor în populația Karakul a arătat o predominanță a alelei ARQ (88.6%), indicând necesitatea intervențiilor genetice pentru a crește frecvența alelei ARR, asociată cu o rezistență crescută la scrapie. Prin comparație cu alte studii care au încercat de asemenea să stabilească determinimul genetic al scrapiei, Houston și col. (2003) au utilizat cartografierea locusului pentru caractere cantitative (QTL) și studii de asociere la nivelul genomului (GWAS) pentru a estima heritabilitatea susceptibilității la scrapie, evidențiind importanța identificării regiunilor genomului asociate cu rezistența. Deși abordările metodologice diferă, ambele studii subliniază importanța selecției genetice în îmbunătățirea rezistenței la scrapie.

Lipsa informațiilor detaliate despre pedigree-ul complet al indivizilor poate influența estimările parametrilor genetici, subliniind necesitatea unor date mai complete pentru analize viitoare. Mediul în care animalele sunt crescute poate influența semnificativ manifestarea fenotipurilor, adăugând variabilitate în estimări. Studiile suplimentare ar trebui să ia în considerare diferite condiții de mediu și practici de management. Valorile heritabilității obținute în acest studiu sunt orientative și nu trebuie folosite ca valori de referință definitive fără validări suplimentare. Sunt necesare studii suplimentare care să includă o gamă mai largă de condiții de mediu și date mai detaliate despre părinți și descendenți.

CAPITOLUL IX. ASOCIEREA GENOTIPURILOR CU CARACTERELE DE PRODUCȚIE

Analiza datelor din tabelul 9.1. a relevat că greutatea la naștere și culoarea blănii sunt corelate semnificativ cu performanțele productive ale oilor Karakul, în timp ce genotipurile individuale și scorul mieilor nu au arătat corelații semnificative. Modelul utilizat a explicat doar o mică parte din variația totală a datelor, sugerând că alți factori, neincluși în analiză, pot influența performanțele productive. Aceste rezultate subliniază necesitatea unor cercetări suplimentare pentru a identifica alți factori genetici și de mediu care contribuie la variația performanțelor productive.

Greutatea la naștere a avut o corelație pozitivă semnificativă cu performanțele productive ale oilor Karakul, sugerând că acest parametru este un predictor important, în timp ce genotipurile individuale și scorul mieilor nu au arătat corelații semnificative cu caracterele productive, indicând o influență neglijabilă asupra performanțelor productive și sugerând că modelul utilizat a explicat doar o mică parte din variația totală a datelor, existând alți factori neincluși în analiză care influențează aceste performanțe.

Este necesară identificarea altor factori genetici și de mediu care contribuie la variația performanțelor productive, incluzând nutriția, condițiile de mediu și practicile de management. Studiile viitoare ar trebui să exploreze aceste influențe utilizând seturi de date mai mari și diverse pentru a dezvolta strategii de management genetic mai precise și eficiente, îmbunătățind astfel sănătatea și productivitatea populațiilor de ovine. Prin comparație cu alte studii care au încercat să descopere relația dintre scrapie și caractere de producție, Comparativ cu alte studii, cum ar fi cele realizate de De Vries et al. (2004), Hanrahan et al. (2008) și Moore et al. (2009), rezultatele noastre sunt în concordanță cu ideea că asocierea între genotipurile PrP și performanțele productive

poate varia considerabil între diferite rase. Aceste studii au explorat relația complexă dintre genotipurile PrP și performanța animalelor, evidențiind variabilitatea între rase și condiții de creștere. Studiile lui Swalha și col. (2007) au arătat că greutatea la naștere influențează semnificativ caracteristicile de supraviețuire, dar nu explică asocierile dintre supraviețuire și genotipurile PrP. În absența infectării cu scrapie, alela ARQ, susceptibilă la scrapie, poate conferi o viabilitate mai mare, explicând persistența acesteia în populațiile de oi. De asemenea, Swalha și col. (2007) au observat că genotipurile PrP susceptibile au avut o supraviețuire mai mică în turmele afectate de scrapie, dar nu au putut lega direct mortalitatea crescută de forma de scrapie preclinică.

CAPITOLUL X. ESTIMAREA VALORII DE AMELIORARE PENTRU REZISTENȚA LA SCRAPIE

Modelul biometric cu prag utilizează o variabilă continuă neobservabilă (liabilitatea) pentru a determina categoria de răspuns pentru rezistența la scrapie, bazată pe genotipurile descendenților. Studiul a evaluat 212 descendenți, născuți de la 212 oi împerecheate cu 52 berbeci tați, în trei categorii ordinale de rezistență. De exemplu, berbecul tată T001 a avut doi descendenți genotipați ca ARQ/ARQ, încadrați în categoria 2 de răspuns, indicând rezistență moderată, iar berbecul T003 a avut 3 descendenți în 3 ani de producție diferiți, toți cu același genotip, dar cu performanțe distincte. După ce datele au ajuns la convergență, exprimate la iterația finală, s-au obținut soluțiile pentru efectele fixe (an calendaristic, vârsta mamei, sex etc) și soluțiile pentru efectul genetic al berbecilor tați.

Tabelul soluțiilor arată pragurile și soluțiile pentru efectele fixe și genetice pe parcursul a șase iterații, utilizate pentru a clasifica indivizii în funcție de rezistența la scrapie. Efectele fixe ale anului de producție și vârstei mamei variază, indicând influențe diferite asupra rezistenței, în timp ce sexul descendentului are o influență similară pentru masculi și femele. Efectele genetice ale berbecilor tați variază, reflectând diferențe în transmiterea rezistenței. Pentru calcularea probabilităților de răspuns într-o categorie de rezistență, se utilizează pragurile și coeficienții din ultimele iterații, obținându-se astfel probabilități pentru categoriile de rezistență la scrapie.

Rezultatele din tabel evidențiază necesitatea prioritizării berbecilor cu probabilități ridicate de a produce descendenți din Categoria 1 pentru îmbunătățirea rezistenței la scrapie. Genotipurile din Categoria 2 trebuie gestionate cu atenție, iar cele din Categoria 3 ar trebui eliminate din selecție. Majoritatea descendenților se încadrează în Categoria 2, indicând o rezistență moderată, iar proporția descendenților din Categoria 3 este foarte scăzută, ceea ce este favorabil pentru programul de reproducere. Astfel, strategia de reproducere ar trebui să se concentreze pe maximizarea descendenților cu rezistență ridicată, utilizând berbecii din Categoria 1 și gestionând atent cei din Categoria 2.

În final, toate probabilitățile distribuției genotipurilor pentru fiecare tată la toți anii, vârstele și sexele au fost calculate și prezentate în tabelul 11.3.6. Majoritatea berbecilor tați acceptați pentru reproducție au arătat o probabilitate ridicată de a produce descendenți rezistenți la scrapie, cea mai mare parte a descendenților încadrându-se în Categoria 2 cu rezistență moderată, dar și o proporție semnificativă de descendenți foarte rezistenți (Categoria 1). De exemplu, berbecii T029 și T027 au probabilități de 52.96% și respectiv 50.08% de a produce descendenți în Categoria 1, ceea ce îi face ideali pentru programele de ameliorare genetică.

Pe de altă parte, Categoria 3, care include genotipurile cu susceptibilitate ridicată la scrapie, are probabilități mai scăzute, ceea ce este pozitiv. Totuși, berbecii precum T004 prezintă o probabilitate de 13.59% pentru descendenți în această categorie, subliniind necesitatea eliminării acestor berbeci din programele de selecție pentru a reduce riscul de scrapie. Tabelul 11.3.7 arată o distribuție diferită a probabilităților, cu berbecii T047 și T030 având probabilități mai mici pentru Categoria 1 și mai ridicate pentru Categoria 2. De asemenea, berbecii T001 și T004 prezintă probabilități mai mari pentru Categoria 3, sugerând un risc crescut de a produce descendenți susceptibili la scrapie. Prin urmare, selecția genetică ar trebui să prioritizeze berbecii cu probabilități ridicate în Categoria 1 și să evite berbecii cu probabilități ridicate în Categoria 3. Acest contrast subliniază importanța unei selecții riguroase pentru îmbunătățirea sănătății generale și rezistenței la scrapie a efectivelor de ovine.

Analiza statistică a datelor utilizând modelul biometric cu prag (threshold) a demonstrat că berbecii cu probabilități ridicate în Categoria 1, cum ar fi T029 (52.96%) și T027 (50.08%), trebuie prioritizați în programele de reproducție, deoarece aceștia au șanse mari de a produce descendenți cu rezistență foarte ridicată la scrapie, reprezentând astfel o strategie esențială pentru îmbunătățirea generală a rezistenței la această boală în populația de oi. Deși Categoria 2 cuprinde genotipuri cu rezistență moderată care contribuie la diversitatea genetică, este crucial ca programul de ameliorare să se concentreze pe reducerea treptată a acestor genotipuri în favoarea celor din Categoria 1. În contrast, berbecii din Categoria 3, precum T008 (2.61%) și T013 (1.61%), ar trebui eliminați din selecție pentru a minimiza riscul de transmitere a susceptibilității la scrapie.

O intensitate mare a selecției pentru rezistența la scrapie poate crește numărul de indivizi rezistenți în populație, dar poate avea și un impact negativ asupra altor caractere economice importante, cum ar fi greutatea la fătare, culoarea robei și punctajul obținut la evaluările de performanță. Astfel, selecția pentru rezistența la scrapie trebuie să fie bine echilibrată, monitorizând atent caracterele de producție și menținând diversitatea genetică pentru a asigura un echilibru optim între rezistența la scrapie și performanțele generale de producție.

Utilizarea modelului biometric cu prag a permis o analiză detaliată a caracterelor categoriale de rezistență la scrapie, facilitând o evaluare mai precisă a influențelor genetice asupra rezistenței la această boală. Analiza datelor colectate de la 212 descendenți, împerecheați cu 52 de berbeci tați, a evidențiat variabilitatea rezistenței la scrapie influențată atât de factorii genetici cât și de cei de mediu. Efectele fixe ale vârstei mamei și anului de producție, alături de efectele genetice ale berbecilor tați, au contribuit semnificativ la această variabilitate. Rezultatele subliniază importanța integrării acestor factori în programele de ameliorare genetică pentru a optimiza selecția și a îmbunătăți rezistența generală a efectivelor de oi la scrapie.