

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ - BUCUREȘTI
FACULTATEA DE ZOOTEHNIE**

Valentina Leliana Părvulescu

**CONTRIBUȚII LA REALIZAREA HĂRȚILOR
CROMOSOMALE LA SUINE**

**CONTRIBUTIONS TO THE REALISATION OF THE
PIG CHROMOSOMAL MAPS**

**TEZĂ PENTRU OBTINEREA TITLULUI DE
„DOCTOR” ÎN DOMENIUL „ZOOTEHNIE”**

Conducător de doctorat

Prof. Dr. Ștefan Popescu - Vifor

**București
2005**

CUPRINS
CONTENTS

INTRODUCERE	pag. 5
CAPITOLUL 1	
CONCEPTE GENERALE PRIVIND CARIOTIPUL ȘI HĂRȚILE CROMOSOMALE LA ANIMALE.....	pag. 10
<i>(GENERAL CONCEPTS CONCERNING THE CARYOTYPE AND THE CHROMOSOMAL MAPS FOR ANIMALS)</i>	
1.1. CONCEPTE GENERALE PRIVIND CARIOTIPUL.....	pag. 10
1.1.1. Definiții și particularități.....	pag. 10
1.1.2. Cariotipul la suine.....	pag. 13
1.1.3. Cariotipul la câteva specii de mamifere.....	pag. 16
1.2. CONCEPTE GENERALE PRIVIND HĂRȚILE CROMOSOMALE.....	pag. 17
1.2.1. Definiții, particularități.....	pag. 17
CAPITOLUL 2	
POSSIBILITĂȚI DE STUDIERE A CARIOTIPULUI ȘI DE REALIZARE A HĂRȚILOR CROMOSOMALE.....	pag. 20
<i>(POSSIBILITIES OF STUDYING THE CARYOTYPE AND THE MAKING OF THE CHROMOSOM MAPS)</i>	
2.1. CARIOTIPUL.....	pag. 20
2.1.1. Scurt istoric.....	pag. 20
2.1.2. Metode de evidențiere a cromosomilor.....	pag. 20
2.1.3. Alcătuirea cariotipului.....	pag. 22
2.2. HĂRȚILE CROMOSOMALE.....	pag. 23
2.2.1. Bandarea.....	pag. 23

2.2.2. Utilizarea polimorfismului de lungime al fragmentelor de restricție (RFLP).....	pag. 28
2.2.3. Utilizarea microsateleților.....	pag. 29
2.2.4. Metoda PCR (Polymerase chain reaction).....	pag. 30
2.2.5. Metoda hibridării celulelor somatice.....	pag. 31
2.2.6. Hibridarea „ in situ” prin fluorescență (FISH).....	pag. 33
2.2.7. Metoda electroforezei în gel șicâmp pulsat	pag. 35
2.2.8. Secvențializarea nucleotidică.....	pag. 36

CAPITOLUL 3

REALIZĂRI PE PLAN MONDIAL PRIVIND CARTAREA CROMOSOMALĂ LA ANIMALE ÎN GENERAL ȘI LA SUINE ÎN SPECIAL.....	pag. 37
<i>(ACHIEVEMENTS CONCERNING THE CHROMOSOMAL MAPPING FOR ANIMALS AND ESPECIALLY FOR PIGS)</i>	

3.1. Bandarea cromosomilor la diferite specii.....	pag. 38
3.2. Hărți cromosomale la câteva specii de mamifere și păsări.....	pag. 40

CAPITOLUL 4

MATERIAL ȘI METODĂ.....	pag. 49
<i>(MATERIAL AND METHOD)</i>	

4.1. Materialul biologic.....	pag. 49
4.2. Metode.....	pag. 49

CAPITOLUL 5

ANALIZA CARIOTIPULUI.....	pag. 55
<i>(ANALYSING THE CARYOTYPE)</i>	

5.1. Analiza cariotipului la subiecții din rasa Marele Alb.....	pag. 55
5.2. Analiza cariotipului la subiecții din rasa Landrace.....	pag. 63
5.3. Analiza cariotipului la subiecții din rasa Duroc.....	pag. 71
5.4. Analiza cariotipului la subiecții din Linia Sintetică Periș.....	pag. 78

CAPITOLUL 6

ANALIZA REZULTATELOR BANDĂRII.....pag. 89

(ANALYSING THE BANDING'S RESULTS)

6.1. Analiza rezultatelor bandării G la subiecții din rasa Marele Alb..pag.90

6.2. Analiza rezultatelor bandării G la subiecții din rasa Landrace...pag. 102

6.3. Analiza rezultatelor bandării G la subiecții din rasa Duroc.....pag. 114

6.4. Analiza rezultatelor bandării G la subiecții din Linia

Sintetică Periș.....pag. 127

CONCLUZII.....pag. 140

(CONCLUSIONS)

BIBLIOGRAFIE.....pag. 142

(BIBLIOGRAPHY)

INTRODUCERE

Genetica moleculară, ingineria genetică și biotehnologiile sunt domenii ale biologiei cu o evoluție extrem de rapidă datorită exploziei de date acumulate, referitoare la structura, exprimarea și modelarea artificială a materialului genetic.

Dacă la mijlocul secolului trecut, nimeni nu și-ar fi închipuit nici măcar, că va fi posibilă cunoașterea structurii genelor și a mecanismelor prin care ele se exprimă în diferite sisteme celulare, într-o perioadă relativ scurtă, acest lucru a devenit posibil, reușindu-se chiar să se descopere și să se perfecționeze tehnicile de secționare și de recombinare a moleculelor de ADN, să se proiecteze și să se sintetizeze pe cale artificială gene, capabile de exprimare în celulele receptoare.

Genetica, știință relativ tânără, este domeniul care a cunoscut cel mai rapid proces de dezvoltare, având ritmul cel mai înalt de acumulare de noi cunoștințe. Metodele moderne de cercetare au contribuit la explicarea naturii și mecanismelor de acțiune ale informației genetice, punând la dispoziție fapte și date atât pentru studiul problemelor generale ale eredității, cât și pentru elucidarea diverselor entități patologice.

Genetica animală a trăit și ea marile prefaceri ale secolului XX, iar ultimul deceniu a adus revelația unor rezultate de excepție. Se poate aminti de rezultatele obținute în transformarea microorganismelor prin transferul de informație genetică de la un organism la altul sau rezultatul din aprilie 1997, de realizare a reproducerii animalelor prin tehnologia genetică de clonare.

Ameliorarea animalelor, așa cum este general acceptată în epoca actuală, nu depinde numai de abilitatea geneticianului de a rezolva problemele practice, ci și de măsura în care această intervenție, cu profunde implicații economice, etice și ecologice este permisă.

Cunoscând și înțelegând, însă legile care guvernează formarea, dezvoltarea și existența organismelor vii, omul are posibilitatea să acționeze în direcția formării unor organisme care să satisfacă din ce în ce mai mult trebuințele sale.

Cercetările de genetică au acumulat deja un bagaj de date care au permis progrese uriașe în medicină, lăsând să se întrevadă pentru viitor, noi perspective fascinante de cercetare în diferite ramuri medicale (oncologie, neurologie), cât și în domeniile ecologie, agricultură, creșterea animalelor, industrie alimentară.

S-au dezvoltat în mod deosebit tehnicile de recombinare a ADN-ului, tehnicile de clonare, etc.

Aceste progrese ultrarapide au dus la dezvoltarea biotehnologiilor moderne, care se anunță a fi marea forță a secolului al XXI-lea și în care se pune speranța, că va reuși să rezolve problemele cele mai spinoase ale societății omenești (alimentația și starea de sănătate).

Biotehnologiile moderne constituie domeniul cel mai nou și cu perspective deosebite de dezvoltare a biologiei contemporane, datorită descoperirilor teoretice cu impact deosebit în aplicarea lor în practică.

Pe plan mondial se fac eforturi susținute pentru dezvoltarea cercetărilor privind manipularea materialului genetic de la microorganismele, plante și animale.

Toate progresele înregistrate în ultimii ani în domeniul acestor biotehnologii se datorează în cea mai mare parte descoperirilor realizate în planul geneticii moleculare, entitate bine precizată de domeniul științei. Aceasta, ca parte integrantă a biotehnologiilor, grupează un întreg ansamblu de tehnici și metode neconvenționale prin care se obțin celule sau microorganismele cu proprietăți ereditare noi (reprogramate genetic).

Organismele reprogramate genetic stau apoi la baza obținerii de numeroase substanțe utile din punct de vedere economic, în industria farmaceutică, alimentară, valorificarea superioară a unor resurse materiale, obținerea de noi soiuri de plante și rase de animale.

În cadrul biotehnologiilor moderne, un rol important îl ocupă „ingineria genetică” care ar putea fi definită ca un ansamblu de tehnici și metode, de regulă neconvenționale, care ocolesc ciclul sexual, prin care se obțin celule sau organisme cu proprietăți

ereditare noi, prin formarea și încorporarea de noi combinații de material genetic natural sau “artificial”, exogen. Aceste tehnici sunt destinate fie să aducă un caracter nou, favorabil, neinclus inițial în patrimoniul ereditar al organismului respectiv, fie să înlocuiască o porțiune defectuoasă a materialului genetic respectiv, de exemplu o genă anormală sau mutantă, domeniu cunoscut sub denumirea de „terapie genică”.

Prin folosirea tehnicilor de inginerie genetică au putut fi create bănci de gene ale unor organisme foarte variate : virusuri, levuri, bacterii, insecte, păsări, mamifere, fiecare reprezentând o colecție de molecule de ADN în care intră gene ale unei alte specii.

În ultima vreme, tehnicile de inginerie genetică sunt aplicate în cercetări din numeroase domenii ale biologiei (taxonomie, fiziologie, biologia dezvoltării, imunologie). Ele permit, de exemplu, încadrarea taxonomică a unor specii de plante noi, animale sau microorganisme, identificarea unor gene, a funcțiilor acestora și a căilor metabolice în care sunt implicate.

De asemenea dezvoltarea unor tehnici speciale de secvențializare a genelor sau tehnologia PCR (reacția de polimerizare în lanț), a permis abordări mult mai fine, mai de amănunt, legate de structura intimă a genelor, de reglarea funcțiilor genelor sau de identificarea genelor după clonare.

După cum se știe, structura fundamentală a ADN impune o serie de condiții mecanismelor moleculare, care asigură protejarea acestora în cadrul cromosomului. Astfel, la un pH fiziologic, scheletul ADN conține 21 atomi de oxigen încărcăți negativ pentru fiecare rotație a spiralelor α . Ca urmare, proteinele histonice care îl înfășoară, trebuie să fie bogate în aminoacizi care au lanțurile încărcate pozitiv la un pH fiziologic (în special cele bogate în lizină și arginină).

Din aceste motive o importanță deosebită o are cunoașterea și studierea genomului, al cărui prim obiectiv este localizarea genelor în structura fiecărui cromosom, stabilirea secvenței genelor în cromosom precum și a distanței dintre ele.

Reprezentările grafice, liniare, a secvenței genelor în structura cromosomilor sunt denumite **hărți cromosomale**.

Fiecare cromosom al unei specii are propria hartă genetică. Alcătuirea hărților cromosomale constituie procesul de cartare sau cartografiere genică.

În prezent se înregistrează o accelerare a activității de cartare genică a speciilor, datorită atât folosirii unor tehnologii avansate cât și prin participarea unor echipe mari de cercetători în cadrul cărora fiecare grupă lucrează pe segmente de cromosomi individuali.

Cercetările efectuate în domeniul cartării genice au urmărit în general două direcții :

- stabilirea unor tehnici de lucru cât mai eficiente, care să permită localizarea genelor, precum și evidențierea cât mai clară a secvențelor acestora.

- alcătuirea unor hărți cromosomale la diferite organisme, atenție acordându-se în ultimul timp eucariotelor.

* * *

În teza de doctorat, elaborată în cadrul pregătirii prin doctorat la Facultatea de Zootehnie din București, am încercat să pătrund în acest domeniu deosebit de complex și să realizez, prin folosirea uneia dintre tehnicile de cartare (bandarea cromosomală), o analiză comparativă referitoare la structura cromosomilor la suine, folosind sânge prelevat de la exemplare (masculi și femele), din rasele Marele Alb, Landrace, Duroc și din Linia Sintetică Periș.

Teza este structurată în 6 capitole la care se adaugă introducerea, concluziile și bibliografia.

În CAPITOLUL 1 sunt descrise conceptele generale referitoare la cariotip și la hărțile cromosomale la animale.

CAPITOLUL 2 este destinat prezentării posibilităților de studiere a cariotipului precum și a posibilităților de realizare a hărților cromosomale. Realizarea hărților cromosomale prin metoda bandării este descrisă mai detaliat.

În CAPITOLUL 3 sunt prezentate realizările pe plan mondial în ceea ce privește cartarea cromosomală la animale în general și la suine în special arătând care este stadiul actual de cunoaștere în domeniu.

CAPITOLUL 4 este destinat prezentării materialului biologic și metodelor folosite în cercetarea personală. A fost aleasă pentru studiu, o etapă preliminară în realizarea hărților cromosomale la suine și anume bandarea G.

CAPITOLUL 5 cuprinde analiza cariotipului la cele patru rase de suine luate în studiu. De asemenea în capitol se fac comparații între masculi și femele și între rasele studiate.

CAPITOLUL 6 cuprinde analiza rezultatelor bandării la subiecții studiați făcându-se și comparațiile între masculi și femele precum și între rasele studiate.

În realizarea acestui obiectiv, un ajutor deosebit de prețios am primit de la domnul Profesor Ștefan Popescu-Vifor, care mi-a coordonat lucrarea cu multă răbdare și înțelegere, și cu un deosebit profesionalism, pentru care îi sunt recunoscătoare, de la familia mea, în special Cosmin, fiul meu, care a decis că domeniul este foarte interesant, de la Armando, nepotul meu și de la sora mea, care a învățat între timp ce înseamnă cromosomii, de la prietenii care mi-au stat aproape!

De asemenea aduc mulțumiri pe această cale conducerii S.C. Romsuintest S.A. Periș, și în special lui Dan, Cristian și Flori, care au lucrat alături de mine.