

---

TEZA DE DOCTORAT

# Îmbunătățirea indicilor de reproducție prin metode moleculare și hormonale la rasele de ovine autohtone

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

---

Doctorand **Alexandru-Marius Deac**

---

Conducător de doctorat **Prof. dr. Marius Zăhan**

---



# INTRODUCERE

Tradiția creșterii ovinelor în România este împletită în mod complex cu cultura țării, în special în regiunile muntoase și de deal. Având în vedere aceste aspecte, dar și datorită faptului că România se află pe locul 2 în Uniunea Europeană în ceea ce privește efectivele de ovine, pentru anul 2022 Eurostat raportând un efectiv de 10,24 milioane de capete (16,7% din totalul U.E.), este necesară îmbunătățirea performanțelor productive și reproductive a raselor autohtone.

Producția de carne de miel constituie sursa primară de venituri pentru crescătorii de ovine la scară globală (Young și colab., 2014). Prolificitatea unei turme, care reprezintă numărul de miei obținuți de la o femelă adultă la o fătare, joacă un rol esențial în determinarea producției anuale de miei pentru întregul efectiv.

Metodele de creștere a numărului de produși obținuți anual de la efectivul matcă pot fi moleculare sau hormonale. Astfel, metodele genetice pot fi aplicate în vederea unei îmbunătățiri permanente a prolificității, proces care este de lungă durată, iar metodele hormonale pot fi aplicate imediat, rezultând în creșterea cantității și calității de carne de miel livrabilă per unitate de timp.

Studierea la nivel molecular a genelor asociate cu prolificitatea prezintă o importanță deosebită, deoarece aceasta poate duce la o eficientizare a procesului de selecție din cadrul programelor de ameliorare prin includerea informațiilor genetice ale animalelor. De-a lungul timpului, a fost dovedit faptul că mutațiile dintr-un grup de gene strâns înrudite, care fac parte din superfamilia factorului de creștere transformator- $\beta$  (TGF $\beta$ ) cresc semnificativ rata ovulației la ovine (Davis, 2005).

Biotehnologiile de reproducție reprezintă un instrument eficient în vederea accelerării progresului genetic în cazul ovinelor (Nicholas, 1996). Aceste tehnici cuprind diverse abordări, dintre care unele îmbunătățesc procesul de selecție (însămânțările artificiale, transferul de embrioni), în timp ce altele accelerează progresul genetic prin scurtarea intervalului între generații, prin obținerea de produși de la femele impubere prin tehnica fecundația in vitro (Zăhan și Miclea, 2020).

Această teză de doctorat este structurată pe două părți distincte, prima fiind reprezentată de "Stadiul actual al cunoașterii", care cuprinde două capitole, respectiv „**Cap. 1.** Metode moleculare de îmbunătățire a indicilor de reproducție” și „**Cap. 2.** Metode de dirijarea endocrină a funcției de reproducție la ovine”. Cea de-a doua parte, intitulată "Contribuția personală" cuprinde șapte capitole: „**Cap. 3.** Obiectivele urmărite”, „**Cap. 4.** Materiale și metode – aspecte generale”, „**Cap. 5.** Identificarea polimorfismelor uninucleotidice la nivelul genei asociate cu prolificitatea (BMP15) la trei rase de ovine autohtone”, „**Cap. 6.** Testarea unui protocol de sincronizare a ciclurilor sexuale în timpul sezonului de reproducție la rasa Țigaie, varietatea Ruginie”, „**Cap. 7.** Identificarea unui protocol optim de inducere și sincronizare a ciclurilor sexuale în afara sezonului de reproducție la rasa Merinos de Cluj” și „**Cap. 8.** Concluzii generale și

recomandări” și “**Cap. 9.** Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei”. În continuare va fi prezentat rezumatul acestor capitole. De asemenea, această teză de doctorat cuprinde un număr de 13 tabele și 25 de figuri.

## **1. Metode moleculare de îmbunătățire a indicilor de reproducție**

În cadrul capitolului 1 sunt prezentate principalele mijloace moleculare de îmbunătățire a indicilor de reproducție la ovine, în special a caracterului de prolificitate. Sunt descrise pe scurt principalele gene care au fost documentate anterior ca fiind implicate în procesul de foliculogeneză, denumite gene majore, toate fiind membre ale superfamiliei factorului de creștere transformator- $\beta$  (TGF $\beta$ ). De asemenea, sunt prezentate și implicațiile funcționale ale acestor gene asupra funcției de reproducție. Problematika stabilirii unei prolificități optime în funcție de sistemul de creștere este dezvoltată în cadrul acestui capitol. Cele trei gene de fecunditate descrise din familia BMP sunt: receptorul proteinei morfogenetice osoase de tip IB (BM $PR1B$ ; Fec $B$ ) situat pe cromozomul 6 (Souza și colab., 2001), factorul de diferențiere a creșterii 9 (GDF9; Fec $G$ ) pe cromozomul 5 (Hanrahan și colab., 2004) și proteina morfogenetică osoasă 15 (BMP15; Fec $X$ ) pe cromozomul X (Hanrahan și colab., 2004).

### **1.1. BMP15 (proteina morfogenetică osoasă 15)**

Prima genă de fecunditate descrisă este reprezentată de proteina morfogenetică osoasă 15 (BMP15; Fec $X$ ). Pe parcursul acestui subcapitol este prezentată structura genomică a acestei gene, fiind precizate date precum intervalul genomic, numărul de perechi de baze (pb), numărul de exoni și introni, așa cum sunt prezentate în baza de date NCBI (National Center for Biotechnology Information). De asemenea, sunt descrise și principalele caracteristici funcționale a BMP15, modul în care influențează activitatea ovariană, rata ovulației și implicit prolificitatea. Toate mutațiile documentate anterior, asociate cu prolificitatea ovinelor sunt descrise. Astfel, pentru fiecare dintre aceste variante genetice este prezentată modificarea la nivelul secvenței de codare și impactul acesteia asupra structurii aminoacizilor din proteina BMP15. Mutațiile descrise în cadrul acestui subcapitol sunt: Fec $X^I$  (c.896T>A; p.V299D), Fec $X^H$  (c.871C>T; p.Q291\*), Fec $X^B$  (c.1100G>T; p.S367I), Fec $X^G$  (c.718C>T; p.Q238\*), Fec $X^L$  (c.962G>A; p.C321Y), Fec $X^R$  (c.525\_541delTGGGTCCAGAAAAGCCC; p.W154Nfs\*55), Fec $X^O$  (c.1009A>C; p.N337H), Fec $X^{Bar}$  (c.301\_304delGCTAinsT; p.A101Cfs\*113), c.755T>C (p.L252P), Fec $X^{RA}$  (c.1172C>T; p.T400).

## 1.2. GDF9 (factorul de diferențiere a creșterii 9)

O altă genă autozomală majoră care afectează prolificitatea, esențială pentru foliculogeneza normală, este reprezentată de factorul de diferențiere a creșterii 9 (GDF9), numită și FecG. Ca și în cazul subcapitolului anterior, este prezentată structura genomică a acestei gene, fiind precizate date precum intervalul genomic, numărul de perechi de baze (pb), numărul de exoni și introni, așa cum sunt prezentate în baza de date NCBI (National Center for Biotechnology Information). De asemenea, sunt descrise și principalele caracteristici funcționale a GDF9, modul în care influențează activitatea ovariană, rata ovulației și implicit prolificitatea. Mutațiile descrise în cadrul acestui subcapitol sunt: FecG<sup>H</sup> (c.1184C>T; p.S395F), FecG<sup>T</sup> (c.1279A>C; p.S427R), FecG<sup>E</sup> (c.1034T>G; p.F345C).

## 1.3. BMPR-1B (proteina morfogenetică osoasă 1B)

Gena BMPR-1B (cunoscută și ca ALK6 sau FecB), codifică receptorii proteinei morfogenetice osoase 1B din ovare (Davis, 2005). Exact ca și în cazul BMP15 și GDF9 pe parcursul acestui subcapitol sunt descrise principalele caracteristici funcționale a BMPR-1B, fiind prezentate și detaliile legate de structura genomică a acestei gene, intervalul genomic, numărul de perechi de baze (pb), numărul de exoni și introni, așa cum sunt prezentate în baza de date NCBI (National Center for Biotechnology Information). Până în prezent, o singură variantă asociată cu prolificitatea a fost identificată la nivelul BMPR-1B, respectiv mutația Booroola (FecB<sup>B</sup>: c.746A>G; p.Q249R).

# 2. Metode de dirijarea endocrină a funcției de reproducție la ovine

Pe parcursul acestui capitol sunt prezentate principalele metode de dirijare endocrină a funcției de reproducție la ovine. De asemenea, sunt descrise avantajele utilizării tehnicilor de reproducere asistată (TRA) în vederea sporii productivității fermei, prin îmbunătățirea performanțelor reproductive a ovinelor. Astfel, în continuare sunt prezentate atât "metodele naturale" de inducere a estrului la ovine, cât și metodele hormonale, realizate prin administrarea de hormoni exogeni.

## 2.1. Metode naturale

Majoritatea animalelor domestice, printre care și ovinele, au fost domesticate din specii sălbatice care s-au dezvoltat în climat temperat (Gupta, 2004). Acestea au păstrat până în zilele noastre reproducția sezonieră, fiind o adaptare a mamiferelor care

au evoluat pentru a trăi în regiunile reci și temperate. În cadrul acestui subcapitol sunt prezentate metodele care nu necesită administrarea de hormoni exogeni, ci presupun crearea unor condiții naturale de stimulare a activității de reproducție, fie prin supunerea acestora la un regim artificial al fotoperioadei (creșterea duratei de expunere la întuneric, care determină o creștere a nivelurilor sangvine de melatonină), fie prin introducerea în turmă a unuia sau a mai multor indivizi care să stimuleze activitatea de reproducție a femelelor, efect cunoscut și sub denumirea de biostimulare.

### **2.1.1. Manipularea artificială a fotoperioadei**

La ovine, în timpul zilelor scurte, creșterea nivelului melatoninei servește ca un cod intern de percepție a fotoperioadei externe, melatonina produsă la nivel ridicat codificând zile scurte (stimulatoare), iar cantitatea sangvină scăzută a acesteia codifică zile lungi (inhibitoare) (Malpoux și colab., 1996). De asemenea, în cazul berbecilor, fotoperioada scurtă este asociată cu sporirea proporției spermatozoizilor vii, a celor mobili și reducerea frecvenței anomaliilor acrozomale (Zăhan și Miclea, 2020). Astfel, prin utilizarea clădirilor izolate de lumină sau a unei iluminări suplimentare artificiale pot fi create condițiile specifice sezonului de reproducție.

### **2.1.2. Biostimularea**

Una dintre metodele care presupun cheltuieli de infrastructură mai mici este reprezentată de biostimularea femelelor cu ajutorul masculului (cunoscut și ca “efectul berbecului” sau “efectul masculului”). Inducerea estrului la oile aflate în anestr sezonier prin introducerea berbecilor în turmă a fost documentată de mult timp (Underwood și colab., 1944). De asemenea, sunt prezentate și metodele de stimulare a estrului prin „efectul femelă-femelă”, iar în cazul stimulării activității sexuale a masculilor sunt descrise „efectul femelei” și “efectul mascul-mascul”. Deoarece costurile biostimulării sunt neglijabile, această tehnică a fost adoptată cu succes de mult timp în vederea inducerii estrului în afara sezonului de reproducție la ovine (Martin și colab., 1986).

## **2.2. Metode hormonale**

Având în vedere ca așa-zisele “metode naturale” sunt fie dificil de aplicat (manipularea artificială a fotoperioadei), fie nu dau întodeauna rezultate satisfăcătoare (biostimularea), pe parcursul acestui subcapitol sunt prezentate metodele hormonale de inducere și sincronizare a ciclurilor sexuale la ovine. În vederea inducerii estrului, hormonii exogeni joacă un rol esențial, cu agenți precum progestagenii, prostaglandinele, gonadorelinele, gonadotropinele și melatonina fiind folosiți în mod uzual.

### **2.2.1. Progestageni**

Utilizarea hormonilor progestageni în vederea inducerii și sincronizării ciclurilor estrale la ovine se bazează pe principiul simulării prezenței corpului galben (Zăhan și Miclea, 2020). Tratamentele cu progesteron sunt utilizate atât pentru protocoale de scurtă durată (5-7 zile de expunere la progesteron), cât și pentru protocoale de lungă durată (12-14 zile), în combinație cu gonadotropine (Menchaca Alejo și colab., 2017), femelele prezentând estru la aproximativ 48 de ore după îndepărtarea dispozitivului (Abecia și colab., 2012). De asemenea, pe parcursul acestui sub-subcapitol sunt prezentate și principalele avantaje și efecte adverse asociate cu utilizarea acestui hormon.

### **2.2.2. Prostaglandine**

O metodă alternativă de control a funcției de reproducție la ovine este inducerea luteolizei, care are ca efect declanșarea fazei foliculare, urmată de ovulație. Prostaglandinele care intervin în reglarea funcției de reproducție sunt PGF<sub>2</sub>α și PGE<sub>2</sub>α (Miclea și colab., 2010). Utilizarea prostaglandinelor ca agenți luteolitici a revoluționat dirijarea ciclurilor sexuale, acestea având rolul de a induce rapid regresia corpului galben (mai ales în fazele de declin ale acestuia), permițând astfel manifestarea acțiunii stimuloare a hormonilor gonadotropi, dar și o uniformizare a răspunsului ovarian (Zăhan și Miclea, 2020). Și în cazul prostaglandinelor, principalele avantaje și efectele negative asociate cu administrarea acestora la ovine sunt descrise.

### **2.2.3. Gonadoreline**

GnRH (Hormonul de eliberare a gonadotropinelor) este secretat de către hipotalamus, care ulterior ajunge în capilarele din eminența mediană a sistemului port hipotalamo-hipofizar (Miclea și colab., 2010). Activitatea secretorie de gonadotropine (GnRH) este controlată endocrin și neural. Endocrin, asupra hipotalamusului acționează hormonii steroizi (estrogenii și testosteronul), prostaglandine, melatonina și unii neurotransmițători centrali (acetilcolina, adrenalina, dopamina, serotonina, neurotensina, endorfinele, encefalinele) (Miclea și colab., 2010).

Inducerea poliovulației prin intermediul gonadorelinelor (GnRH) este posibilă la unele specii datorită rolului acestora de a stimula hipofiza pentru eliberarea de FSH și LH, printre care și ovinele (Zăhan și Miclea, 2020).

### **2.2.4. Gonadotropine**

Pentru a maximiza efectul administrării progestagenilor și a prostaglandinelor, administrarea de gonadotropine extrahipofizare, cum sunt PMSG (pregnant mare serum

gonadotropin - gonadotropină serică de iapă gestantă) sau eCG (equine chorionic gonadotropine - gonadotropină corionică ecvină) și hCG (human chorionic gonadotropine - gonadotropină corionică umană) sunt folosite frecvent (Zăhan și Miclea, 2020). Rolul gonadotropinelor în ceea ce privește inducerea și sincronizarea estrului la ovine este menit să stimuleze creșterea foliculară, maturarea și ovulația (Hameed și colab., 2021).

### **2.2.5. Melatonina**

Melatonina stimulează secreția de GnRH și LH prin reducerea activității tirozinhidroxilazei (Viguié și colab., 1997). Administrarea exogenă continuă a melatoninei prin intermediul implantelor subcutanate (18 mg melatonină) permite mimarea zilelor scurte specifice sezonului de reproducție de toamnă, chiar și în sezonul de primăvară sau vară (Pădeanu, 2011). Momentul aplicării implanturilor este important pentru a garanta o bună eficacitate. Astfel, introducerea acestora în jurul solstițiului de vară este aplicată pe scară largă ca mijloc de avansare a sezonului de reproducție la ovinele din zone mai nordice decât N45° (Haresign și colab., 1990) sau mai sudice decât S45° (McMillan și Sealey, 1989).

## **3. Obiectivele urmărite**

Obiectivele urmărite în cadrul acestei lucrări au vizat identificarea unor metode moleculare și hormonale de îmbunătățire a indicilor de reproducție la rasele de ovine autohtone. Astfel, în continuare au fost descrise punctual cele 3 obiective ale aceste teze de doctorat, și anume: “3.1. Identificarea la rasele de ovine autohtone a unor variante genetice la nivelul genelor majore membre ale superfamiliei factorului de creștere transformator- $\beta$  (TGFB) asociate cu prolificitatea ovinelor”, “3.2. Testarea unui protocol de sincronizare a ciclurilor sexuale în timpul sezonului de reproducție la rasa Țigaie, varietatea Ruginie”, “3.3. Identificarea unui protocol optim de inducere și sincronizare a ciclurilor sexuale în afara sezonului de reproducție la rasa Merinos de Cluj”.

## **4. Materiale și metode – aspecte generale**

În cadrul acestu capitol sunt prezentate aspectele legate de materialul biologic utilizat în cadrul acestei lucrări, standardele bioetice, materialele, reactivii și hormonii utilizați, aparatura de lucru folosită precum și echipamentele software utilizate.

## **5. Identificarea polimorfismelor uninucleotidice la nivelul genei asociate cu prolificitatea (BMP15) la trei rase de ovine autohtone**

Primul studiu efectuat în cadrul acestei teze de doctorat, care răspunde și primului obiectiv enunțat, și-a propus identificarea polimorfismelor uninucleotidice la nivelul genei asociate cu prolificitatea (BMP15) la trei rase de ovine autohtone. Îmbunătățirea caracterelor de reproducție prezintă un mare interes pentru industria creșterii ovinelor. Datorită impactului său pozitiv asupra profitabilității acestei industrii, prolificitatea este una dintre cele mai semnificative caractere din punct de vedere economic, prezentând diferențe inter și intra-rasiale în cazul ovinelor (*Ovis aries*). De-a lungul timpului, a fost demonstrat că diferite mutații ale genelor aparținând superfamiliei factorului de creștere și transformare beta (TGFβ), precum BMPR-1B, BMP15 și GDF9 care codifică pentru proteine ce influențează rata ovulației și dimensiunea cuibului la ovine. Numeroase polimorfisme uninucleotidice (SNP) identificate la nivelul genei proteinei morfogenetice osoase 15 (BMP15) au fost asociate cu prolificitatea ovinelor. Astfel, au fost recoltate probe de sânge de la treizeci de femele prolifiche (2-3 ani), aparținând rasei Merinos de Cluj (n = 10), Țurcană (n = 10) și Țigaie, varietatea Ruginie (n = 10) de la diferite ferme din Transilvania, România. Ovinele selectate au figurat doar cu fătări gemelare sau multigemelare în registrele de montă și fătare (RMF). Folosind tehnica amplificării PCR țintită și secvențierea Sanger, am identificat SNP-uri în stare heterozigotă în exonul 2 al BMP15 la trei rase de oi crescute în România: Țigaie, Merinos de Cluj și Țurcană. Analiza secvenței a evidențiat trei mutații documentate anterior, și anume mutația cu sens greșit (missens) c.755T>C (L252P), care poate duce la modificări în structura terțiară a proteinei BMP15 și două mutații silențioase, c.747T>C (P249P) și c.1047G>A (V349V). În plus, am identificat și o nouă mutație silențioasă, c.825G>A (S275S). Pe baza acestor constatări, dar și a datelor disponibile în literatura de specialitate, am reușit identificarea a patru hotspot-uri mutaționale presupuse în exonul 2 al BMP15 care ar putea fi luate în considerare în vederea îmbunătățirii caracterelor de reproducție a raselor autohtone de ovine prin genotiparea animalelor.

## **6. Testarea unui protocol de sincronizare a ciclurilor sexuale în timpul sezonului de reproducție la rasa Țigaie, varietatea Ruginie**

Există o varietate de protocole și produse hormonale pe piață, dar încă nu este clar cum vor funcționa acestea în condiții specifice de teren. Eficacitatea utilizării diferitelor forme de analogi ai prostaglandinei F2α, cum ar fi dinoprost și cloprostamol, în cadrul



unor protocoale de sincronizare a estrului bazate pe efectul progestagenic al FGA, a fost comparată în cadrul acestui studiu. În acest scop, pe baza unui design complet randomizat, 60 de oi (rasa Țigaie, varietatea Ruginie; 2–4 ani, scor mediu corporal de  $2,5 \pm 0,5$ ) au fost împărțite în două loturi experimentale și expuse la două tipuri de protocoale de sincronizare a estrului, care au inclus: bureți intravaginali impregnați cu acetat de fluorogestonă (FGA) timp de 11 zile, cu administrarea unei injecții intramusculare de 5 mg dinoprost în ziua 9, urmată de administrarea a 300 U.I. PMSG la momentul eliminării bureților (lotul FGA-D-PMSG, n=30), iar pentru celălalt lot s-a urmat același protocol de sincronizare, singura diferență constând în faptul că loc de dinoprost, femelele au fost tratate cu 75  $\mu$ g de cloprostenol (lotul FGA-C-PMSG, n=30). Procentul de femele care au intrat în estru (%ERR) a variat între 76,66% (grupul FGA-C-PMSG) și 93,33% (grupul FGA-D-PMSG). Conform rezultatelor acestui studiu, se poate afirma că PGF $2\alpha$  (natural sau sintetic) poate să influențeze rezultatele unui protocol de sincronizare FGA-PGF $2\alpha$ -PMSG de 11 zile, în ceea ce privește apariția comportamentului specific de călduri. În plus, costul tratamentelor hormonale pentru fiecare protocol a fost calculat pentru a determina metoda cea mai rentabilă și dacă aceasta poate fi implementată într-un mod eficient la nivel de fermă.

## **7. Identificarea unui protocol optim de inducere și sincronizare a ciclurilor sexuale în afara sezonului de reproducție la rasa Merinos de Cluj**

Scopul acestui studiu a fost acela de a compara trei protocoale de inducere și sincronizare a ciclurilor sexuale, urmată de însămânțare artificială la moment fix (FTAI) în afara sezonului de reproducție, la ovine din rasa Merinos de Cluj aflate în anestrul sezonier. Estrul a fost sincronizat la 80 de oi multipare sănătoase, folosind bureți intravaginali care conțin 20 mg de acetat de fluorogeston (FGA), timp de 14 zile. Femelele au fost repartizate anterior în trei loturi experimentale. La momentul îndepărtării bureților, oilor din loturile II și III le-a fost administrată o doză de 500 UI PMSG, în timp ce cele din lotul I au primit o jumătate de doză, respectiv 250 UI PMSG, urmată de 50  $\mu$ g de GnRH, 30 de ore mai târziu. Ovinelor din lotul III le-au fost aplicate anterior mini-implanturi subcutanate de melatonină, mai exact cu 20 de zile înainte de începutul tratamentului cu progestageni. Nu am putut constata diferențe semnificative în ceea ce privește performanțele reproductive între lotul I (47,05%) și II (56,52%). Cu toate acestea, au existat diferențe semnificative ( $P < 0,05$ ) între lotul III, suplimentat cu melatonină, și lotul I (63,33% față de 47,05%). Astfel, potențiala substituție a PMSG cu GnRH trebuie încă optimizată, în timp ce suplimentarea cu melatonină poate crește rata concepției în afara sezonului de reproducție la ovine aflate în anestrul sezonier.

## 8. Concluzii generale și recomandări

În ceea ce privește primul obiectiv urmărit, analizele genetice au relevat prezența unui total de patru mutații la nivelul exonului 2 al genei BMP15 la rasele Țurcană și Merinos de Cluj. Din păcate, la rasa Țigaie, varietatea Ruginie, nu am reușit să identificăm nicio variantă, toate alelele fiind de tip sălbatic. Una dintre mutațiile identificate este nouă (c.825G>A; p.S275S), nefiind identificată până în prezent la nicio rasă de ovine din lume. Astfel, am înregistrat această mutație nouă în baza de date GenBank/NCBI cu numărul de acces OQ593381. Mutația c.755T>C (p.L252P) a avut o eficacitate documentată în creșterea prolificității ovinelor, iar această variantă nu induce sterilitate în stare homozigotă.

Pentru cel de-al doilea obiectiv, protocolul utilizat pentru lotul FGA-D-PMSG a determinat o rată de răspuns la estru (%ERR) mai mare decât cel folosit în cazul lotului FGA-C-PMSG (93,33% vs. 76,66%), care ar putea fi influențată de o eficiență luteolitică superioară a dinoprost în comparație cu cloprostenol. Costurile protoalelor au fost similare (aproximativ 5,70 euro/oaie).

În final, pentru cel de-al treilea obiectiv, studiul efectuat a relevat că toate cele trei protoale testate sunt potrivite pentru inducerea și sincronizarea estrului în vederea însămânțării artificiale la moment fix (FTAI) în afara sezonului de reproducție la rasele de ovine autohtone aflate în aneștru sezonier. Suplimentarea cu mini-implanturi subcutanate de melatonină a determinat cea mai bună rată de concepție, iar GnRH are potențialul de a înlocui PMSG în afara sezonului de reproducție.

În urma acestor concluzii, se recomandă includerea mutației c.755T>C (p.L252P) ca marker genetic în cadrul viitoarelor programe de ameliorare care își propun să îmbunătățească prolificitatea raselor de ovine autohtone. Studiile ulterioare ar putea avea ca scop determinarea penetranței genetice a variantelor identificate, respectiv c.747T>C (p.Pro249=), c.755T>C (p.Leu252Pro), c.1047G>A (p.Val349=), c.825G>A (p.Ser275=) dar și asocierea lor cu prolificitatea luând în considerare un eșantion mai numeros. De asemenea, pe baza rezultatelor obținute, se recomandă utilizarea protoalelor de sincronizare și inducere a ciclurilor sexuale testate în cadrul acestui studiu, atât în timpul sezonului de reproducție, cât și în afara lui.

## 9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea acestei lucrări derivă din faptul că a fost caracterizată pentru prima dată gena asociată cu prolificitatea (BMP15) la trei rase de ovine autohtone românești. Contribuțiile inovative ale tezei rezultă din secvențierea în premieră și identificarea a patru mutații la nivelul exonului 2 al acestei gene, care pot duce la o îmbunătățire a indicilor de reproducție. Una dintre aceste mutații a fost nouă, nefiind indentificată până în prezent la nicio rasă din lume. Astfel, am înregistrat această mutație nouă în baza de date GenBank/NCBI cu numărul de acces OQ593381. De asemenea, în

cadrul acestei lucrări a fost testată pentru prima dată eficacitatea dintre forma naturală (dinoprost) și cea sintetică (cloprostenol) a prostaglandinei F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) folosită ca agent luteolitic într-un protocol care presupune și administrarea unui analog al progesteronului, respectiv acetat de fluorogestonă (FGA) și ser de iapă gestantă (PMSG). Un alt aspect de originalitate rezultă din testarea posibilității înlocuirii a jumătate din doza de PMSG cu GnRH, dar și influența suplimentării protocoalelor cu mini-implanturi subcutanate de melatonină asupra performanțelor reproductive a raselor de ovine autohtone în afara sezonului de reproducție în vederea însămânțării artificiale la moment fix (FTAI).

**BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

1. Abecia, J. A., Forcada, F., González-Bulnes, A. (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 173-179. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.01.011
2. Davis, G.H. (2005). Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 37 Suppl 1(Suppl 1), S11-23. doi:10.1186/1297-9686-37-s1-s11
3. Eurostat. [https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/APRO\\_MT\\_LSSHEEP/default/table?lang=en](https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/APRO_MT_LSSHEEP/default/table?lang=en)
4. Gupta, A.K. (2004). Origin of agriculture and domestication of plants and animals linked to early Holocene climate amelioration. *Current Science*, 87(1), 54-59.
5. Hameed, N., Khan, M.I., Zubair, M., Andrabi, S.M.H. (2021). Approaches of estrous synchronization in sheep: developments during the last two decades: a review. *Tropical Animal Health and Production*, 53(5), 485. doi:10.1007/s11250-021-02932-8
6. Hanrahan, J.P., Gregan, S.M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G.H., Powell, R., Galloway, S.M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70(4), 900-909. doi:10.1095/biolreprod.103.023093
7. Haresign, W., Peters, A.R., Staples, L.D. (1990). The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. *Animal Production*, 50(1), 111-121. doi:10.1017/S0003356100004517
8. Malpaux, B., Vigué, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., Pelletier, J., Chemineau, P. (1996). Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*, 42(1), 109-117. doi:https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01505-9
9. Martin, G.B., Oldham, C.M., Cognié, Y., Pearce, D.T. (1986). The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams — A review. *Livestock Production Science*, 15(3), 219-247. doi:https://doi.org/10.1016/0301-6226(86)90031-X
10. McMillan, W.H. Sealey, R.C. (1989). Do melatonin implants influence the breeding season in Coopworth ewes? Paper presented at the Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.
11. Menchaca Alejo, Dos Santos Neto, Pedro, Cuadro, Federico. (2017). Estrous synchronization treatments in sheep: Brief update Atualização nos protocolos de sincronização do cio em ovinos. *Animal reproduction*, 41, 340-344.
12. Miclea, V., Zăhan, M., Miclea, I. (2010). *Reproducția animalelor de fermă*. Cluj-Napoca: Editura Accent.
13. Nicholas, F.W. (1996). Genetic improvement through reproductive technology. *Animal Reproduction Science*, 42(1), 205-214. doi:https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01511-4
14. Pădeanu, I. (2011). *Biotehnici de reproducere la ovine*. Timișoara: Mirton.
15. Souza, C.J., MacDougall, C., MacDougall, C., Campbell, B.K., McNeilly, A.S., Baird, D.T. (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *Journal of Endocrinology*, 169(2), R1-6. doi:10.1677/joe.0.169r001
16. Underwood, E.J., Shier, F.L., and Davenport, N. (1944). Studies in sheep husbandry in W.A.V. The breeding season of Merino, cross-breed and British Breeds ewes in the agricultural districts. *Journal of the Department of Agriculture, Western Australia*, 11, 135-143.

17. Viguié, C., Thibault, J., Thiéry, J.C., Tillet, Y., Malpoux, B. (1997). Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship to the changes in luteinizing hormone and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Endocrinology*, 138(1), 499-506. doi:10.1210/endo.138.1.4865
18. Young, J.M., Trompf, J., Thompson, A.N. (2014). The critical control points for increasing reproductive performance can be used to inform research priorities. *Animal Production Science*, 54(6), 645-655. doi:https://doi.org/10.1071/AN13269
19. Zăhan, M., Miclea, I. (2020). *Biotehnologii de reproducție*. Cluj-Napoca: Editura Accent.