

Analiza filogenetică a raselor de câini ciobănești românești pe baza secvențelor de ADN mitocondrial

Autor: Drd. Olivier Chakirou (oli3400@yahoo.com)

Coordonator științific: Prof .dr. Augustin Vlaic

Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara Cluj-Napoca

La ora actuală, câinele domestic este cea mai răspândită specie de canide, cu o populație la nivel global de aproximativ 400 milioane de indivizi, având cea mai largă distribuție geografică dintre toate speciile domestice. Dintre mamifere, câinii domestici sunt remarcabili datorită multitudinii de variațiuni naturale pe care le prezintă din punct de vedere al caracteristicilor morfologice și comportamentale, chiar dacă păstrarea raselor de câini se face după standarde stabilite, astfel că în cadrul fiecărei rase animalele prezintă adesea o morfologie și un comportament uniform și distinct. Există mai mult de 400 de rase la nivel mondial, iar importanța lor economică este substantială.

Una dintre direcțiile de cercetare la specia canină este reprezentată de către studiile de filogenie și biodiversitate, câinele fiind specia de mamifere cu cea mai mare variabilitate fenotipică. În urma acestor studii se analizează diversitatea raselor, relațiile filogenetice dintre rasele și speciile de canide și se stabilesc de asemenea haplotipurile comune și distanțele genetice. În România există patru rase de câini ciobănești (Ciobănescul Carpatin, Ciobănescul de Bucovina, Ciobănescul Mioritic și Ciobănescul Corb), asupra cărora nu s-au efectuat nici un fel de analize la nivel de ADN până în momentul de față.

Scopul acestui studiu este de a afla legăturile filogenetice din cadrul rasele autohtone de câini ciobănești românești, precum și cele dintre rasele românești și alte rase de câini asupra cărora s-au efectuat anterior cercetări la nivel molecular.

ADN-ul mitocondrial reprezintă o unealtă foarte puternică pentru cercetarea filogenetică deoarece, spre deosebire de ADN-ul nuclear se transmite doar pe linie maternă. Această caracteristică facilitează monitorizarea transmiterii sale pe parcursul liniilor evolutive începând cu evoluția sa timpurie. Un alt avantaj este că ADN-ul mitocondrial prezintă un grad mare de variabilitate și o rată mare de mutație comparativ cu ADN-ul nuclear. Acest tip de ADN nu suferă însă de recombinare cum se întâmplă în cazul ADN-ului din nucleul celulei. Aceste aspecte fac ca ADN-ul mitocondrial să fie ideal pentru studiile de filogenie și filogeografie.

Acest articol reprezintă o parte dintr-un studiu mai amplu realizat asupra câinilor ciobănești la nivel de ADN mitocondrial. Rezultatele complete vor fi publicate într-o revistă de specialitate în momentul terminării cercetărilor.

Obiectivele și activitățile cercetării

- 1. Obținerea și analizarea secvențelor de ADN mitocondrial la cele patru rase de câini ciobănești românești.**

Pentru realizarea acestui obiectiv au fost întreprinse următoarele activități:

- au fost identificate expozițiile canine internaționale și naționale la care au participat câini din rasele de ciobănești românești. S-au luat în considerare doar câini specifici rasei care au Carte de Origine Română (pedigree) și care au primit un calificativ excelent în urma jurizării din cadrul expoziției;
- au fost recoltate probe de sânge de la câini ciobănești aparținând celor patru raselor românești;
- s-a realizat extracția de ADN mitocondrial din probele sanguine recoltate;
- s-au secvențiat probe de ADNmt pentru rasele Ciobănesc de Bucovina, Ciobănesc Carpatin și Ciobănesc Mioritic și Ciobănesc Corb.

2. Stabilirea relațiilor filogenetice ale raselor de câini ciobănești românești pe baza secvențelor de ADN mitocondrial

În cadrul acestui obiectiv s-a urmărit realizarea de arbori filogenetici care să arate relațiile filogenetice dintre rasele de câini Ciobănesc de Bucovina, Ciobănesc Carpatin, Ciobănesc Mioritic și Ciobănesc Corb precum și a relațiilor filogenetice dintre fiecare rasa autohtonă și alte rase de câini, ale căror secvențe nucleotidice sunt disponibile în baza de date Genbank.

Pentru realizarea acestui obiectiv s-au derulat următoarele activități:

- Analiza secvențelor nucleotidice corespunzătoare indivizilor aparținând raselor Ciobănesc de de Bucovina, Ciobănesc Carpatin și Ciobănesc Mioritic. Acest tip de analiză constă în alinierea secvențelor de ADNmt ale indivizilor din aceste rase cu secvențele de ADNmt de la specia canină existente în baza de date Genbank;
- Întocmirea arborilor filogenetici pentru fiecare rasă de câini ciobănești în parte, pe baza rezultatelor obținute prin intermediul analizei secvențelor de ADNmt;
- Compararea secvențelor de ADNmt obținute de la rasele de câini Ciobănesc de de Bucovina, Ciobănesc Carpatin și Ciobănesc Mioritic și stabilirea distanțelor filogenetice dintre acestea.

În studiul de față s-a procedat la secvențierea unei porțiuni de 887 pb din genomul mitocondrial de la patru rase de câini ciobănești românești: Ciobănesc de Bucovina, Ciobănesc Carpatin, Ciobănesc Mioritic și Ciobănesc Corb. Secvența conține un segment al citocromului b, gena care codifică ARNt-Thr, gena care codifică ARNt-Pro și o parte a regiunii de control (poz. 15,259 până la poz. 16146). S-a secvențiat această porțiune deoarece prezintă cea mai mare variabilitate nucleotidică din cadrul genomului mitocondrial.

Material și metodă

Recoltarea probelor de sânge s-a realizat în mai multe etape succesive. Probele de sânge au fost recoltate în cadrul expozițiilor canine (de club, naționale și internaționale) de la indivizi care au fost jurizați în cadrul expoziției. Expozițiile la care s-a recoltat sânge au avut loc în localitățile: Arad, Bistrița, Râșnov, Alba-Iulia, Suceava, Rădăuți și Cluj-Napoca. S-au recoltat în total 85 probe de sânge de la cele patru rase de câini ciobănești românești. Probele

de sânge au fost recoltate în tuburi vidate de tip “vacutainer”, care conțin anticoagulant K₂EDTA și păstrate la congelator. Pentru obținerea unor rezultate corecte în urma analizelor statistice și a analizelor filogenetice a celor patru populații canine este necesară utilizarea unor eșantioane de probe formate doar din indivizi neînrușiți. Din acest motiv nu au putut fi utilizate pentru secvențiere și analiză toate probele recoltate, ci doar o parte a acestora.

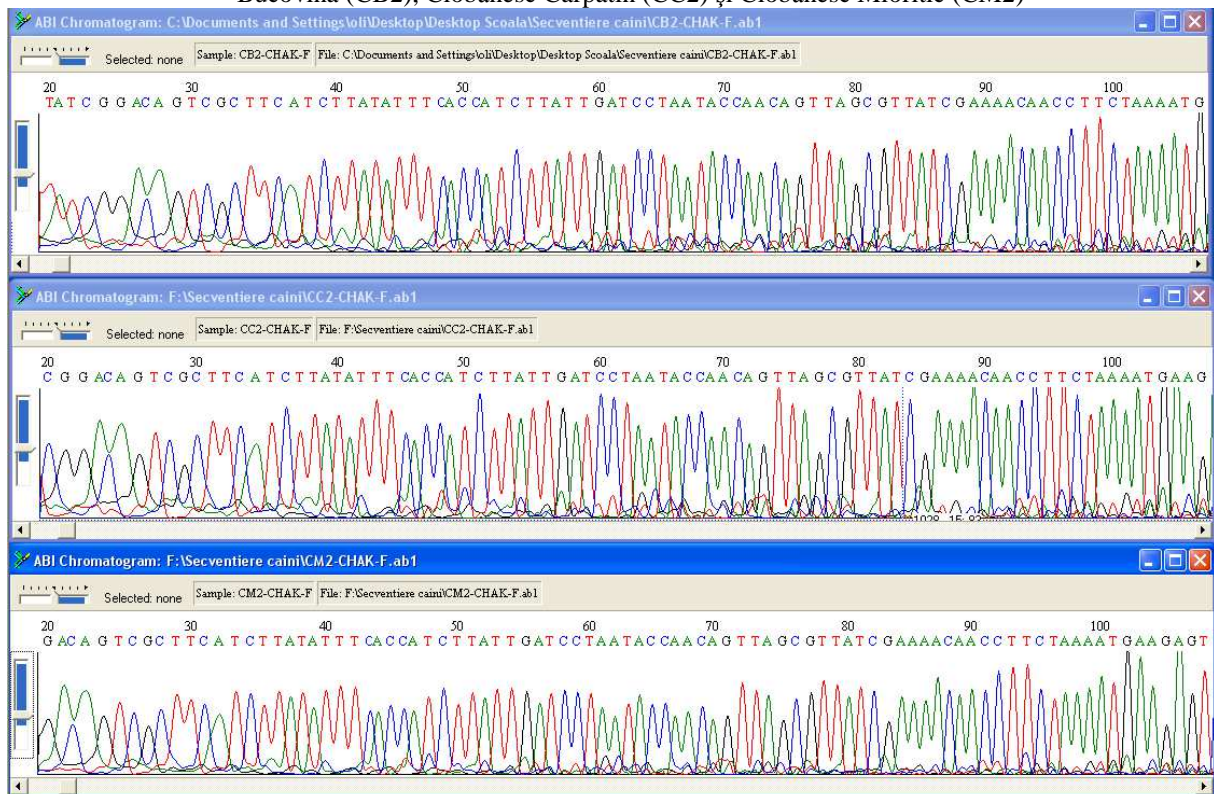
Extracția de ADN din sângele recoltat de la cele patru rase de câini ciobănești românești s-a realizat prin două metode: o metodă clasică de extracție a ADN și o metodă directă de extracție a ADN din sânge pe bază de kit de extracție. S-a extras ADN din toate probele de sânge utilizând ambele metode de extracție. Extracțiile au avut loc în cadrul Laboratorului de Genetică Animală al Facultății de Zootehnie și Biotehnologii.

În scopul pregătirii probelor de ADN mitocondrial pentru secvențiere s-au realizat următorii pași:

- Cuantificarea probelor de ADN extrase
- Amplificarea fragmentelor de ADN prin tehnica PCR
- Purificarea probelor
- Migrarea probelor de ADN în gel de agaroză și verificarea acestora la lumină UV
- Secvențierea probelor de ADN mitocondrial

Rezultate

Cromatogramele rezultate în urma secvențierii probelor de ADN mitocondrial de la rasele Ciobănesc de Bucovina (CB2), Ciobănesc Carpatin (CC2) și Ciobănesc Mioritic (CM2)



În urma secvențierii probelor de ADN mitocondrial au rezultat următoarele secvențe nucleotidice:

Secvența nucleotidică a unui individ din rasa Ciobănesc de Bucovina

TTATATTTTACCACCTTTATTGATCCTAATACCAACAGTTAGCGTTATCGAAAACAACCTTCTAAAATGAAGAGTCTTTGTAGTATAATCATTAC
CTTGGTCTGTAAACCAAAAATGGAGAGTAACCGCCCTCCCTAAGACTCAAGGAAGAAGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCAAAAGCTGAGATT
CTTCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCTACTGTGCTATGTGAGTATCTCCAGGTAACCCCTTCTCCCTCC
CCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTATATCCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATA
ATTCACTGATCTATCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGT
AATGTCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTAACGTGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGGCCATAACT
TTATTTACTCCAATCTACTAATTCTCGCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACTGTGGTGTGATG
CATCTGATATCTTTAATTTTAGGGGGGGAATCTGCTATCACTACCTACGACCGCAACGGCACTAACTTAACTTATCTTCTGCTCTCAGGG
AATATGCCCGTCGGGCCCTAACGCAGTCAAATAAATTGTAGCTGGACTTATTCAATTATCACTACGCATAAAAATCAAGG

Secvența nucleotidică a unui individ din rasa Ciobănesc Carpatin

CGGACAGTCGCTTCATCTTATATTTACCACCTTTATTGATCCTAATACCAACAGTTAGCGTTATCGAAAACAACCTTCTAAAATGAAGAGTCTT
TGAGTATAATCATTACCTTGGTCTTGTAAACCAAAAATGGAGGGTAACCGCCCTCCCTAAGACTCAAGGAAGAAGCTCTTGCTCCACCATCAG
CACCCAAAGCTGAGATTCTTCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCTACTGTGCTATGTAGTATCTCCAGGT
AAACCCCTTCTCCCTCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTATATCCTTACATAGGACAT
ATTAACCTCAACTCTCATAGTTCACTGATCTATCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAAC
CATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTAACGTGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTT
ACTTCAGGGCCATAACTTTATTTACTCCAATCTACTAATTCTCGCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACAC
ATAACTGTGGTGTGATGCATCTGGTATCTTTAATTTTAGGGGGGGAATCTGCTATCACTCACCTACGACCGCAACGGCACTAACTCTAACTT
ATCTTCTGCTCTCAGGGAATATGCCCGTCGGGCCCTAACGCAGTCAAATAAATTGTAGCTGGACTTATTCAATTATCATTATCAACT

Secvența nucleotidică a unui individ din rasa Ciobănesc Mioritic

TTATCGGACAGTCGCTTCATCTTATATTTACCACCTTTATTGATCCTAATACCAACAGTTAGCGTTATCGAAAACAACCTTCTAAAATGAAGAG
TCTTTGTAGTATAATCATTACCTTGGTCTTGTAAACCAAAAATGGAGAGTAACCGCCCTCCCTAAGACTCAAGGAAGAAGCTCTTGCTCCACCA
TCAGCACCCAAAGCTGAAATTTCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCTACTGTGCTATGTGAGTATCTC
CAGGTAACCCCTTCTCCCTCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTATATCCTTACATAG
GACATATCAACTCAATCTCATAATTCATTGATCTGTGACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGA
GAAACCATCAACCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTAACGTGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGGCATCTGG
TTCTTACCTCAGGGCCATAACTTATTTACTCCAATCTACTAATTCTCGCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGAT
CACACATAACTGTGGTGTGATGCATTTGGTATCTTTAATTTTAGGGGGGGAATCTGCTATCACTCATCTACGACCGCAACGGCACTAACTCT
AACTTATCTTCTGCTCTCAGGGGATATGCCCGTCGGGCCCTAATGCAGTCAAATAAATTGTAGCTGGACTTATTCAATTATCATTAT

Secvența nucleotidică a unui individ din rasa Ciobănesc Corb

TCGCTTCAATCTTATATTTACCACCTTTATTGATCCTAATACCAACAGTTAGCGTTATCGAAAACAACCTTCTAAAATGAAGAGTCTTTGTAGT
ATAATCATTACCTTGGTCTTGTAAACCAAAAATGGAGAGTAACCGCCCTCCCTAAGACTCAAGGAAGAAGCTCTTGCTCCACCATCAGCACCCA
AAGCTGAGATTCTTCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCTACTGTGCTATGTGAGTATCTCCAGGTAACCC
TTCTCCCTCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTATATCCTTACATAGGACATATTAAC
TCAATCTCATAGTTCATTGATCTATCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAA
CCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATACTAACGTGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCA
GGGCATAAATTTACTCCAATCTACTAATTCTCGCAAATGGGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGATCACACATAACT
GTGGTGTGATGCATCTGGTATCTTTAATTTTAGGGGGGGAATCTGCTATCACTCACCTACGACCGCAACGGCACTAACTCTAACTTATCTTCT
TGCTCTCAGGGAATATGCCCGTCGGGCCCTAACGCAGTCAAGATAAATTGTAGCTGGACTTATTCAATTATCATTATCAACTCACGCA

Conținutul procentual al bazelor azotate corespunzător celor patru rase de câini ciobănești românești

Rasa	Adenină (%)	Guanină (%)	Timină (%)	Citozină (%)	AT (%)	GC (%)
Ciobănesc de Bucovina	28,8	15,5	26,4	29,6	58,5	41,5
Ciobănesc Carpatin	28,0	15,5	26,5	30,0	58,0	42,0
Ciobănesc Mioritic	27,9	15,3	26,3	30,4	58,4	41,6
Ciobănesc Corb	26,6	15,2	29,9	28,8	55,5	44,5

Pe baza secvențelor nucleotidice rezultate în urma secvențierii probelor de ADNmt de la cele patru rase de ciobănești s-a putut realiza translatarea secvenței de nucleotide în secvența corespunzătoare de aminoacizi. Au rezultat următoarele secvențe aminoacidice:

Secvența aminoacidică corespunzătoare secvenței de ADNmt a unui individ Ciobănesc de Bucovina

LYFTILLILMPTVSVIENNLLKW*VFVV*SLPWSCKPKMESNRPP*DS*KKLLLHHQHPKL*FFLNYSLTPLHSYIESPLLCYVVIS**TL
 LPSPMYVVH*WFAPCM*ACT*YYILT*DMLTQSHNSLIYQQ*SNAYHLVQ*GLNHHAS*NHQPLLVMISLFLSRAHTNVGVTIMKLY
 LASGSYF*AMTLFTPILLILANGTSRWTND*SAHDHT*LVCHASGIF*FLGGESAITHLRPQRH*L*LIFCSQGMCPSP*RSQMTCSW
 TYSLSFINSRMKS*

Secvența aminoacidică corespunzătoare secvenței de ADNmt a unui individ Ciobănesc Carpatin

RTVASSYISPSYWS*YQQLALSKTTF*NEESL*YNHYLGLVNLQKW*VTALPKTQG*SSCSTISTQSWDSS*TIPWHPYIHMLNHPYCA
 MLVSPGKPFSPPLCTSCINGLPHAYKHVHNIMSLH*TY*LNLMVHWSINSNRMHIT*SNKGLITMPRETINPCS*CPSSRSGPMLTWG
 LLSWNYTWHLVLTSGP*LYLLQSY*FSQMGHLDGLMTNQPMITHNCGVMHLVSFNF*GGNLLSLTYDRNGTNSNLSSAL*EYARR
 GPNVAVK*LVAGLIHYHLST

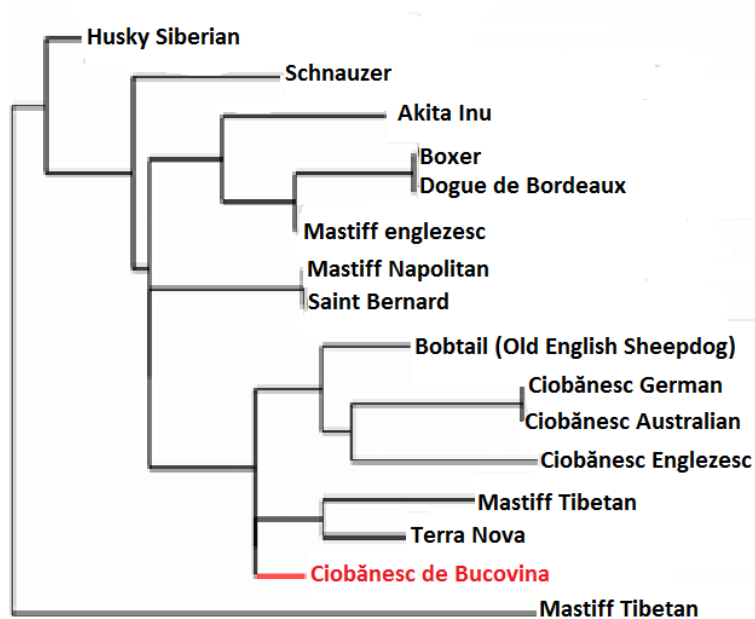
Secvența aminoacidică corespunzătoare secvenței de ADNmt a unui individ Ciobănesc Mioritic

LSDSRFILYFTILLILMPTVSVIENNLLKW*VFVV*SLPWSCKPKMESNRPP*DS*KKLLLHHQHPKLKFFLNYSLTPTPFMYWITPTV
 LCQYLQVNPSSLPYVRRALMVCMPHMSMYMMLYPYMGHINSIS*FIDLSAVIKCMLSPM*A*SPCLEKPSTLARNVPLLAPGPY*R
 GGYHETMPGIWFLPQGHNSIYSNPTNSRKWDISMD*WLISPWSHMTVVSICIWYLLIF*GGICYHSSTATATLTYLLLSGDMPPVA
 ALMQSNNL*LDLFIHY

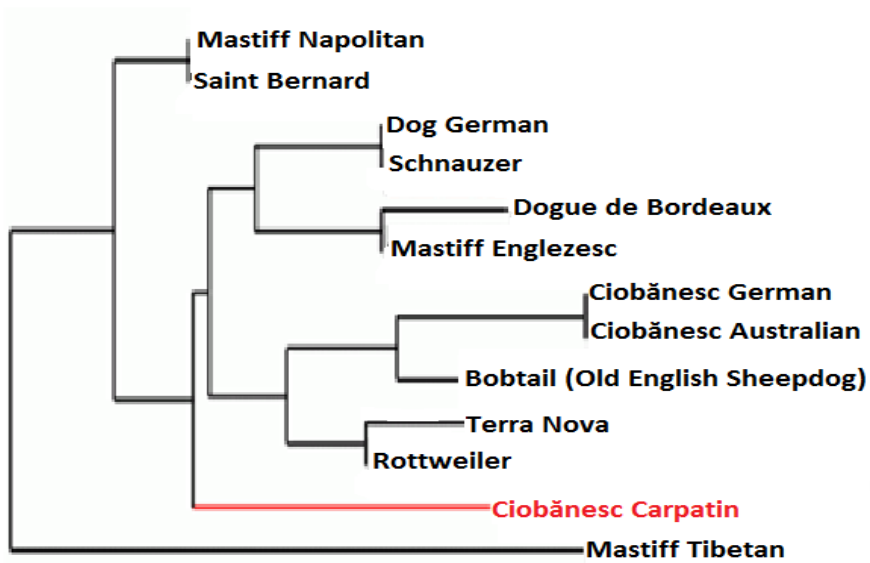
Secvența aminoacidică corespunzătoare secvenței de ADNmt a unui individ Ciobănesc Corb

SLQSYISPSYWS*YQQLALSKTTF*NEESL*YNHYLGLVNLQKW*VTALPKTQG*SSCSTISTQSWDSS*TIPWHPYIHMLNHPYCAM
 VSPGKPFSPPLCTSCINGLPHAYKHVHNIMSLH*TY*LNLMVHWSINSNRMHIT*SNKGLITMPRETINPCS*CPSSRSGPMLTWGLLS
 WNYTWHLVLTSGP*LYLLQSY*FSQMGHLDGLMTNQPMITHNCGVMHLVSFNF*GGNLLSLTYDRNGTNSNLSSAL*EYARRGPN
 AV**LVAGLIHYHLSTHA

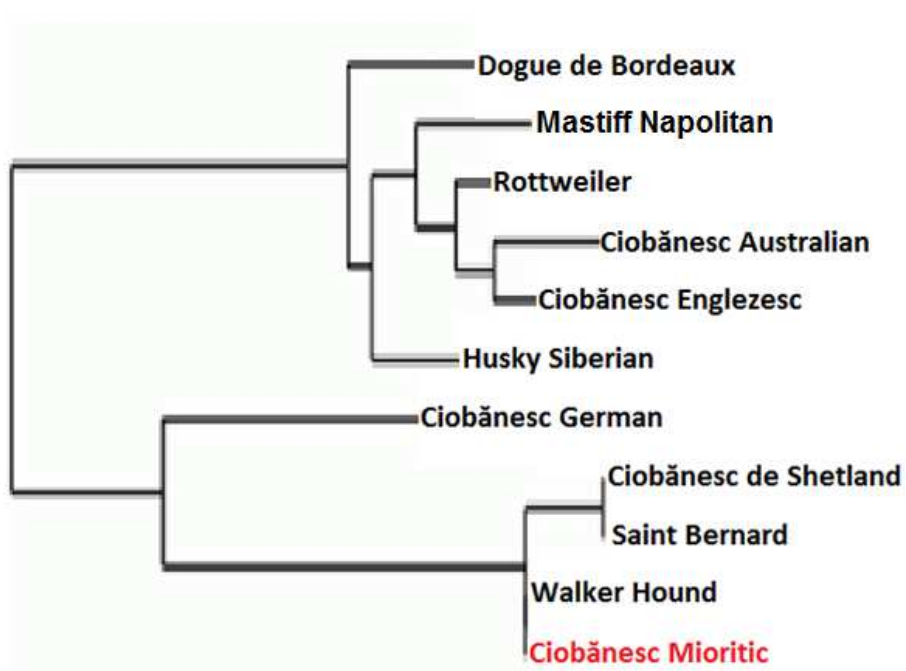
Analiza filogenetică



Arbore filogenetic construit prin metoda probabilității maxime pe baza alinierii BLAST între secvența nucleotidică a Ciobănescului de Bucovina și secvențele nucleotidice a altor rase de talie mare.



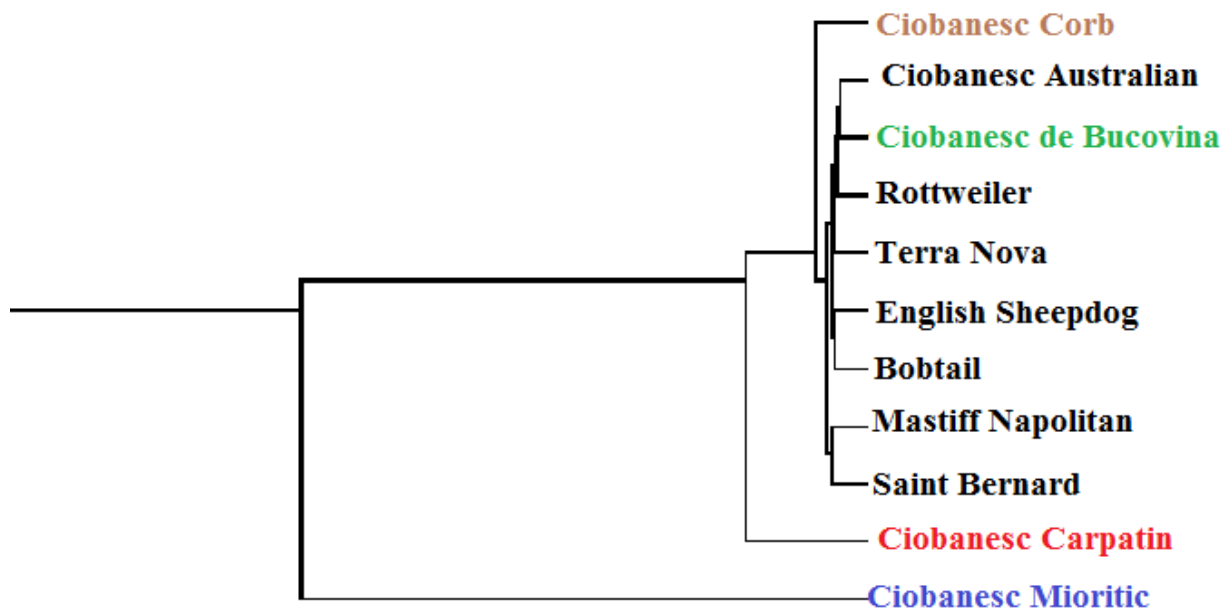
Arbore filogenetic rezultat în urma alinierii BLAST între secvența nucleotidică a Ciobănescului Carpatin și secvențele nucleotidice a altor rase de talie mare.



Arbore filogenetic rezultat în urma alinierii BLAST între secvența nucleotidică a Ciobănescului Mioritic și secvențele nucleotidice a altor rase de talie mare.



Arbore filogenetic de tip Neighbor-joining rezultat în urma alinierii BLAST între secvența nucleotidică a Ciobănescului Corb și secvențele nucleotidice a altor rase de talie mare.



Arbore realizat prin metoda UPGMA rezultat în urma alinierii multiple ClustalW2 între secvențele ciobăneștilor românești și cele altor rase de câini.

Concluzii

Din analiza dendrogramelor corespunzătoare celor patru rase de ciobănești românești se observă că fiecare rasă prezintă afinități genetice diferite la compararea cu alte rase de câini.

Ciobănescul de Bucovina și Ciobănescul Corb au prezentat cea mai mare apropiere de rasele străine de câini luate în studiu. Deși se pot observa asemănări fenotipice între rasele Ciobănesc Corb și Terra Nova, în urma analizei BLAST de aliniere a secvențelor de ADNmt, a rezultat că Ciobănescul Corb este mult mai asemănător din punct de vedere genetic cu rase de câini cu un aspect fizic complet diferit (de exemplu: Pitbull Terrier, Cocker Spaniel, Black Russian Terrier, etc.).

Ciobănescul de Bucovina a manifestat o apropiere genetică mai mare față de Terra Nova decât Ciobănescul Corb. Deși se presupune că ar exista asemănări mai mari între Ciobănescul de Bucovina și Saint Bernard, secvențele nucleotidice ale celor două rase prezintă un nivel mai mare de divergență comparativ cu cele dintre Ciobănescul de Bucovina și Terra Nova.

Secvențele de ADN mitocondrial de la rasa Ciobănesc Mioritic urmate de cele de la rasa Ciobănesc Carpatin au prezentat cea mai mare divergență nucleotidică față de secvențele analizate. Ciobănescul Mioritic este diferit din punct de vedere genetic față de rasa Bobtail (Old English Sheepdog), față de care prezintă asemănări fizice notabile.

Deși se presupune că ar exista o legătură între rasa Ciobănesc Carpatin și rasele Ciobănesc de Karst și Sarplaninac pe lângă asemănările fenotipice, această ipoteză nu a putut fi testată deoarece asupra acestor două rase nu s-au realizat cercetări la nivel de ADN mitocondrial până în momentul de față.

Deși între cele patru rase de câini ciobănești românești există un schimb de gene continuu, fapt observat și din alinierea secvențelor nucleotidice, analizele filogenetice pe baza secvențierii ADN-ului mitocondrial ne arată că avem de-a face cu patru rase de câini distincte, care prezintă caracteristici specifice, deși selecția intensivă conform standardelor a început doar acum 20-30 de ani.