

Veterinarski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

**Genetska razlika između vuka i psa usporedbom kontrolnih
regija mitohondrijske DNA**

Lana Pađen i Maja Maurić, studentice III. godine

Izvedeno na Zavodu za biologiju

Voditelji: Mr. sc. Tomislav Gomerčić, dr. vet. med., Željko Gottstein, dr. vet. med., Martina
Đuras Gomerčić, dr. vet. med.

Zagreb, 2006.

Genetska razlika vuka i psa usporedbom kontrolnih regija mitohondrijske DNA

Lana Pađen i Maja Maurić

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Pađen, L., M. Maurić: Genetska razlika vuka i psa usporedbom kontrolnih regija mitohondrijske DNA

SAŽETAK

Cilj ovog rada je istražiti molekularne razlike između vuka i psa korištenjem kontrolne regije mitohondrijske DNA. U analizi je uspoređeno osam kontrolnih regija različitih životinja, četiri vuka (*Canis lupus*), tri psa (*Canis familiaris*) i jednog sumnjivog uzorka (sumnja se da li je vuk ili pas). Korištene su sekvence koje su izolirane iz uzorka mišićnog tkiva životinja s područja Republike Hrvatske, i sekvence uzete iz genske baze podataka, GenBank, koje su računalnim programima uspoređene i opisane, na temelju čega je napravljeno filogenetsko stablo. Stablo pokazuje klasičnu sistematiku vrsta. Pronađena su specifična mjesta u kontrolnim regijama, bitna za razlikovanje vuka i psa, na temelju kojih je utvrđeno da je majka sumnjivog uzorka bila vuk. Ovom metodom moguće je na temelju male količine DNA razlikovati vukove iz Hrvatske od pasa.

Ključne riječi: mitohondrijska DNA, filogenetsko stablo, vuk, pas

Uvod

U šumama Republike Hrvatske se, među ostalim velikim zvjerima, nalazi i vuk (*Canis lupus*). Budući da je vuk ugrožena i zakonom zaštićena vrsta, izrađen je Plan upravljanja vukom u Hrvatskoj, koji se temelji na poznavanju, praćenju i određivanju veličine populacija tih životinja. (ŠTRBENAC i sur., 2005.)

Pas (*Canis lupus familiaris*) je potekao od vuka prije više od 10 000 godina. (CLUTTON – BROCK, 2001.) Domaći pas je potomak sisavaca mesojeda kod kojih su se još prije više milijuna godina razvila njihova prepoznatljiva obilježja. Prije dva milijuna godina unutar porodice Canidae razvilo se deset skupina mesojeda. Porodici pasa (*Canidae*) pripadaju kojoti, čagljevi, lisice i vukovi. Kad su ljudi počeli živjeti sjedilačkim načinom života, vuk ih je slijedio i promijenio svoj način života. Tako su nastale okolnosti za selektivan uzgoj kojim je stvoren domaći pas. (FOGLE, 2005.)

Životinjska mitohondrijska DNA (mtDNA) specifična je zbog malog genoma jednostavne strukture, prisutnosti u svim tkivima, haploidnosti i jer se nasljeđuje od majke (poznate neke iznimke), različite stope evolucije u pojedinim dijelovima zbog čega je omogućeno rješavanje filogenetskih pitanja (ZHANG i HEWITT, 1996.). Budući da se mitohondriji nalaze u svim stanicama, mtDNA se može lako izolirati iz svih tkiva. MtDNA je mala, kružna, dvolančana DNA molekula. Bitan dio od kojeg se sastoji je nekodirajući dio veličine 1000 parova baza koji se zove kontrolna regija. Dijelovi kontrolne regije od posebne su važnosti jer evoluiraju četiri do pet puta brže od ostatka molekule (TABERLET, 1996.; WHITE i sur., 1998.). Kontrolna regija ne podliježe prirodnoj selekciji i zbog toga je pogodna za filogenetska istraživanja.

Lančana reakcija polimerazom (PCR metoda), omogućuje da se na neinvazivan način istražuju ugrožene vrste, koristeći uzorke s malo DNA kalupa (izmet, dlaku, zube). Metodom PCR – a se umnožavaju određeni geni ili njihovi dijelovi, koji se nakon toga sekvenciraju.

Tako dobiveni podaci se lako razlučuju i lako se tumači slijed nukleotida. (KOCHER i sur. 1989.)

Uspoređivanjem više kontrolnih regija vuka i psa sa područja Republike Hrvatske, htjeli smo pronaći specifična mjesta pomoću kojih bismo ih mogli razlikovati te da li se može na taj način odrediti pripadnost određenih uzoraka pojedinoj vrsti, ukoliko se pronađu lešine kanida nepoznatog i/ili sumnjivog porijekla. U ekološkim istraživanjima i gospodarenju s određenim životinjskim vrstama važno je odrediti kojoj vrsti pripada određeni uzorak, kao što je izmet, dlaka, krv ili komad tkiva.

Cilj ovog rada je istražiti molekularne razlike između populacije vuka i psa u Republici Hrvatskoj, na temelju kojih se može pomoću male količine DNA odrediti pripadnosti jedinke vukovima ili psima.

Materijal i metode

Istraživanje je napravljeno na dva uzorka mišića vuka s područja Gorskog Kotara i Dalmacije, dva uzorka mišića pasa s područja grada Zagreba te jedan uzorak kanida neodređene vrste, s područja Dalmacije, Knin. Na temelju morfoloških podataka kod te životinje nije bilo moguće sa sigurnošću odrediti pripadnost vrsti.

Molekulu DNA izolirali smo iz tkiva standardnim postupkom pomoću kita NucleoSpin Tissue, Macherey – Nagel, Njemačka. Izolat smo umnožili lančanom reakcijom polimerazom koristeći početnice CR1 (5'-CCACTATCAGCACCCAAAGC-3') i CR2R (5'-CCCGGAGCGAGAAGAGG-3') (PALOMARES i sur., 2002). Lančana reakcija polimerazom napravljena je na GeneAmp® PCR System 2400 (Applied Biosystems, SAD), koristeći Multiplex PCR kit (Quiagen, SAD) kroz 35 ciklusa, na 94 °C tijekom 40 sekundi, na 52 °C tijekom 50 sekundi i na 72 °C tijekom 50 sekundi. Nakon umnožavanja lančanom reakcijom polimeraze pročistili smo produkt koristeći QIAGEN MinElute PCR Purification

Kit. Pročišćeni produkti lančane reakcije polimerazom sekvenciran je na Zavodu za molekularnu biologiju (Laboratorij za molekularnu genetiku) instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu, na uređaju ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer.

U radu smo koristili i sekvence mitohondrijske DNA (mtDNA), uzete iz genske baze podataka, GenBank, koja se nalazi na internet adresi: www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/. Koristili smo tri mtDNA vuka i jednu mtDNA psa.

U tablici 1. navedena je vrsta životinje, identifikacijski broj u genskoj bazi podataka te zemljopisno područje iz kojeg potječu uzorci, čije su sekvence uspoređivane u ovom radu.

Tablica 1. Vrsta životinje, identifikacijski broj u genskoj bazi podataka te zemljopisno područje iz kojeg potječu uzorci, čije su kontrolne regije mitohondrijske DNA uspoređivane

vrsta životinje	identifikacijski broj	područje iz kojeg potječe uzorak	referenca
vuk1	WCRO 74	Gorski Kotar, Lika	
vuk2	AF115701	Italija	RANDI i sur., 2000.
vuk3	AF115700	Italija	RANDI i sur., 2000.
vuk4	AB007372	Japan	TSUDA i sur., 1997.
pas1		područje grada Zagreba	
pas2		područje grada Zagreba	
pas3	AY656704	Švedska	ANGLEBY i SAVOLAINEN., 2004.
sumnjivi uzorak	WCRO 71	Dalmacija, Knin	

Kontrolne regije uzoraka vukova, pasa i neodređene vrste kanida te kontrolne regije preuzete iz genske baze podataka međusobno su poravnate (multiple alignment) (Tablica 2.) uz pomoć računalnih programa BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 5.0.6. (HALL, 1999.) i ClustlW Multiple alignment (THOMPSON i sur., 1994.). Koristeći program Mega3.1 (KUMAR i sur., 2001.) određen je stupanj sličnosti između pojedinih sekvenci kontrolnih regija te je na temelju toga napravljeno filogenetsko stablo životinjskih vrsta, čije smo mtDNA sekvence obrađivali.

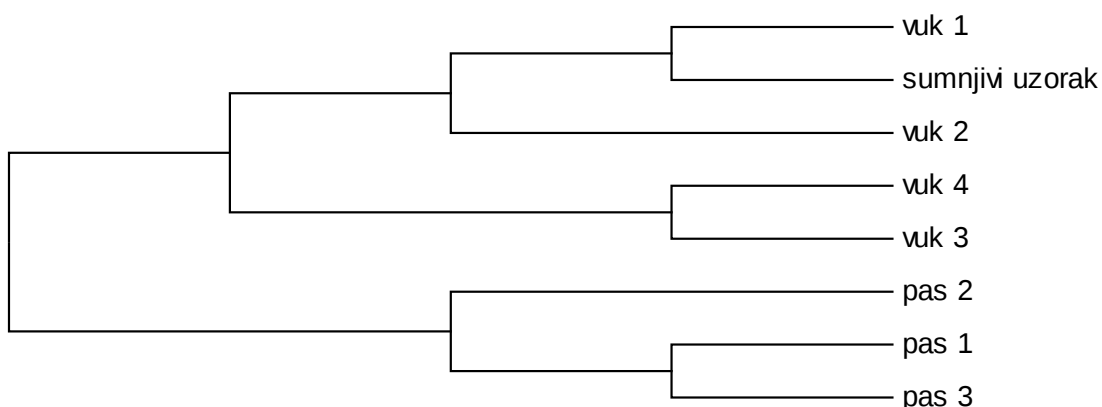
Rezultati

Genetske razlike između vuka, psa te sumnjivog uzorka temeljena na usporedbi 235 baza kontrolne regije mitohondrijske DNA (mtDNA) prikazane su u tablici 2. U tablici su poravnate sekvence 8 životinja te su vidljive različitosti i sličnosti između njih. Kontrolna regija vuka i psa vrlo su slične, no razlikuju se na tri specifična mjesta, a to su 27. mjesto gdje vukovi imaju jednu bazu više od pasa (citozin); te 104. i 129. mjesto na kojem vukovi imaju bazu citozin, a psi timin.

Tablica 2. Poravnate sekvence kontrolnih regija obrađenih životinja

	10	20	30	40	50	60
vuk 1						
vuk 2	TCCAGGTAAA	CCCTTCTCCC	CTCCCCCTAT	GTACGTCGTG	CATTAATGGT	TTGCCCCATG
vuk 3						
vuk 4						
sumnjivi uzorak						
pas 1						
pas 2						
pas 3						
	70	80	90	100	110	120
vuk 1						
vuk 2	CATATAAGCA	TGTACATAAT	ATTATATCCT	TACATAGGAC	ATACTAACTC	AATCTCATAA
vuk 3						C..
vuk 4						C..
sumnjivi uzorak						C..
pas 1						C..
pas 2						C..
pas 3						T..
	130	140	150	160	170	180
vuk 1						
vuk 2	TTCACGTGACC	TATCAACAGT	AATCGAATGC	ATATCACTTA	GTCCAATAAG	GGCTTAATCA
vuk 3						
vuk 4						
sumnjivi uzorak						
pas 1						
pas 2						
pas 3						
	190	200	210	220	230	
vuk 1						
vuk 2	CCATGCCTCG	AGAAACCATC	AACCCTTGCT	CGTAATGTCC	CTCTTCTCGC	TCCGG
vuk 3						
vuk 4						
sumnjivi uzorak						
pas 1						
pas 2						
pas 3						

žuto - specifična mjesta za razlikovanje vuka od psa



Slika 1. Dendrogram, euklidske udaljenosti između analiziranih jedinki

Slika 1. pokazuje grafički evolucijski odnos dobiven na temelju usporedbe kontrolnih regija mtDNA. Životinje koje su bliže, međusobno su sličnije i obrnuto. Psi su međusobno vrlo slični, isto kao što su međusobno slični vukovi i sumnjivi uzorak.

Rasprava

Kontrolne regije vukova i pasa međusobno su vrlo slične, što se poklapa s evolucijom pasa i njihovom morfološkom sličnošću s vukovima. Upravo zbog morfološke sličnosti i evolucije, dobiveni rezultati bili su i očekivani.

Prema rezultatima na molekularnoj razini, za ispitani sumnjivi uzorak s područja Dalmacije, Knin, utvrđeno je da je majka vučica.. Zajedno s vukovima sumnjivi uzorak dijeli specifična mjesta za razlikovanje od pasa.

Dobivene molekularne razlike (na 27., 104. i 129. mjestu) omogućuju specifično razlikovanje vukova i pasa, što može biti vrlo korisno u utvrđivanju počinjenih šteta u gospodarstvu.

Dobiveno filogenetsko stablo se poklapa sa klasičnim filogenetskim stablima.

Različitosti na molekularnoj razini opširno se koriste u ekološkim istraživanjima,

posebno ugroženih i zaštićenih vrsta (vuk), u određivanju kojoj životinji pripada određeni uzorak.

Na temelju molekularnih razlika mitohondrijske DNA, može se pomoću minimalne količine tkiva, sekvencioniranjem, utvrditi da li je određeni uzorak tj. životinja vuk ili pas.

Zaključci

1. Na temelju uspoređenih sekvenci pronađene su razlike između vuka i psa.
2. Sekvencioniranjem kontrolne regije mitohondrijske DNA moguće je razlikovati vukove i pse.
3. Na temelju rezultata, utvrđeno je da je majka sumnjivog uzorka bila vučica.

Zahvala

Zahvaljujemo našem mentoru mr. sc. Tomislavu Gomerčiću, dr. vet. med., na strpljenju, stručnom i tehničkom vodstvu pri izradi ovog rada, asistentu Željku Gottsteinu, sa Zavoda za peradarstvo, na pomoći pri laboratorijskoj izvedbi ovog rada.

Ovaj rad je izrađen u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske "Istraživanje velikih zvijeri u Hrvatskoj" (0053303) uz dopuštenje Ministarstva kulture.

Literatura

- ANGLEBY, H., P. SAVOLAINEN (2004.): Forensic informativity of domestic dog mtDNA control region sequences. Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm 10691, Sweden.
- CLUTTON – BROCK, J. (2001.): Životinje. Mozaik knjiga, Zagreb. str. 185.
- FOGLE, B. (2005.): Nova enciklopedija pasa. LEO – COMMERCE d.o.o. Rijeka. str. 13-14.
- HALL, T. A. (1999.): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95-98.
- KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PAABO, F. X. VILLABLANCA, A. C. WILSON (1989.): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 6196-6200.
- KUMAR, S., K. TAMURA, I. B. JAKOBSEN, M. NEI (2001.): MEGA3: Molecular evolutionary genetics analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- PALOMARES, F., J. A. GODOY, A. PIRIZ, S. J. O'BRIEN, W. E. JOHNSON (2002.): Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for Iberian lynx. Molecular ecology 11, 2171–2182.
- RANDI, E., V. LUCCHINI, M. F. CHRISTENSEN, N. MUCCI, S. M. FUNK, G. DOLF (2000.): Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. Conserv. Biol. 14, 464-473.

- ŠTRBENAC A., Đ. HUBER, J. KUSAK, A. MAJIĆ – SKRBINŠEK, A. FRKOVIĆ, Ž. ŠTAHAN, J. JEREMIĆ – MARTINKO, S. DESNICA, P. ŠTRBENAC (2005.): Plan upravljanja vukom u Hrvatskoj. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Hrvatska. str. 76. – 92.
- TABERLET, P. (1996.): The use mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. U: Molecular genetics approaches in conservation (T. B. Smith, R. K. Wayne, urednici). Oxford University press. New York, Oxford. str. 125–142.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON (1994.): CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- TSUDA, K., J. KIKKAWA, H. YONEKAWA, Y. TANABE (1997.): Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: Evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Department of Laboratory Animal Science; Honkomagome 3-18-22, Bunkyo 113, Japan.
- WHITE, P. S. O. L. TATUM, H. TEGELSTROM, L. D. DENSMORE III (1998.): Mitochondrial DNA isolation, separation and detection of fragments. U: Molecular genetic analysis of population (A. R. Hoelzel, urednik). Oxford University press. New York. str. 65–101.
- ZHANG, D. X., G. M. HEWITT (1996.): Nuclear intergrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in ecology and evolution* 11: 247–251.

Pađen, L., M. Maurić: Genetic difference between wolf and dog comparing the control region of the mitochondrial DNA

ABSTRACT

The objectives of this study were to define the genetic difference between wolf and dog using the control region of mitochondrial DNA sequence variation. In analysis we compared 8 control regions of different animals; 4 grey wolves (*Canis lupus*), 3 dogs (*Canis lupus familiaris*) and 1 suspicious sample (wolf or dog). We took sequences that were isolated from the muscle tissue of animals from Croatia and sequences taken from gene database on Internet (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/) and with computer programs compared control regions, described patterns and made phylogenetic tree. This tree showed a typically classic systematic of species. We found specific places in control regions for differentiation of wolf and dog, and according to that we were able to determinate that the mother of the suspicious sample was a wolf. In the future, using this method we can distinguish wolves from Croatia and dogs having only a small piece of DNA.

Key words: mitochondrial DNA, phylogenetic tree, wolf, dog
