



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Titlul tezei de doctorat: „Estimarea relațiilor filogenetice și cuantificarea diversității genetice la rasele de bovine Sură de Stepă și Pinzgau, aflate în pericol de extincție în România”

Cuvinte cheie: *diversitate genetică; Sură de Stepă; Pinzgau; filogenie; variabilitate genetică; citocrom b; d-loop; markeri mitocondriali; secvențiere genică*

În ultimii 20 de ani, aproximativ 300 de rase din cca. 6000 aparținând unor specii diferite de animale de fermă au fost identificate de către Organizația Națiunilor Unite pentru Alimentație și Agricultură (F.A.O.) ca fiind dispărute sau în pericol de extincție. Principalii factori de risc sunt reprezentați de eroziunea genetică datorată inseminărilor artificiale, presiunea economică asupra fermierilor cu țintă directă asupra obținerii unor producții ridicate a materiilor prime de origine animală (lapte/carne) sau încrucișări între indivizi cu structură genetică diferită (Pariset et al., 2010). În categoria raselor de bovine aflate în pericol de extincție se încadrează două rase locale, respectiv Sura de Stepă și Pinzgau care fac obiectul acestui studiu.

Rasele de bovine indigene din România sunt clasificate de numeroși cercetători în rase primitive (Sura de Stepă și Mocănița) și rase ameliorate (Balțata Românească, Bălțata cu Negru Românească, Bruna, Pinzgau de Transilvania) (Creangă, Maciuc, 2010; Maciuc, 2006).

Rasa de bovine Sură de Stepă din România aparține grupului de rase podolice, întâlnite și în prezent, în diferite zone ale Europei. Originea comună a acesteia, cu alte rase podolice (Iskar Grey, Bulgarian Grey, Istrian, Slavonian Podolian, Katerini, Hungarian Grey, Maremmana, Podolica, Turkish Grey, etc) (Teneva et al., 2005; Pariset, 2010) este strămoșul sălbatic *Bos taurus primigenius*, care a fost declarat dispărut în jurul secolului al XVI-lea, ultima turmă înregistrată fiind în Polonia, în anul 1627 d.Hr. (Götherström et al., 2005; Pitt et al., 2018). Acesta a fost răspândit pe o mare parte din Eurasia și Africa de Nord în timpul a două mari epoci: Pleistocenul târziu și Holocenul timpuriu (Meadow, 1993; Clutton-Brock, 1990), dând naștere celor doi taxoni care au avut un rol crucial în domesticirea bovinelor de astăzi: *Bos taurus* și *Bos indicus* (Park et al., 2015) și care se diferențiază în primul rând prin prezența unei cocoase (specifice pentru *Bos indicus*). Din genul *Bos taurus* fac parte taurinele tipice din Europa, nord-estul Asiei și nordul Africii, adaptate îndeosebi climatului rece (Upadhyay et al., 2017). Numeroase studii au demonstrat faptul că rasele moderne de bovine europene din genul *Bos taurus* se caracterizează prin prezența haplogrupului mitocondrial T (Edwards et al., 2007; Scheu et al., 2008).

Rasa de bovine Pinzgau prezintă importanță majoră în sectorul zootehnic, fiind adaptată pentru creștere și exploatare în zone cu altitudini de 400-1600 m, bogate în precipitații și pajiști naturale fertile, având rezistență ridicată și valorificând foarte bine furajele cu un conținut mare în celuloză (Cotos, 2005; Fisteag, 1956; Fisteag, 1958). Rasa Pinzgau din România s-a format prin încrucișări între vaci din rasa Sură de Stepă și tauri Pinzgauer din Austria (Angelescu, 1974; Mang, 2011).

Referințele bibliografice revizuite (Bradley, Magee, 2006; Georgescu et al., 2008; Creangă et al., 2009; Bittante, 2011; Maretto et al., 2012), cu privire la rasele de bovine indigene, aflate în pericol de extincție în România, confirmă faptul că acestea sunt purtătoare a unei rezerve de gene valoroase ce trebuie conservate prin aplicarea diferitelor biotehnologii de reproducere (Han și Bobiș, 2018).

Pentru elaborarea acestei teze de doctorat, s-au efectuat o serie de cercetări cu scopul de a evalua diversitatea genetică a celor două rase de bovine, Sură de Stepă și Pinzgau, aflate în pericol de extincție în România, prin analiza a doi markeri mitocondriali (citocrom b și d-loop), relevanți pentru studii de diversitate genetică, filogenie, filogeografie moleculară și identificarea relațiilor taxonomice între indivizi din diferite specii.

Prima parte a tezei este realizată în urma consultării referințelor bibliografice din literatura de specialitate, însumând un număr de 3 capitole care abordează aspecte cu privire la diversitatea genetică a bovinelor, pornind de la dovezile arheologice care atestă domesticirea și evoluția acestora, originea și filogenia raselor de bovine europene precum și analiza statusului de risc al raselor Sură de Stepă și Pinzgau din România.

A doua parte a tezei aduce o serie de completări informațiilor existente în literatura de specialitate, cu privire la diversitatea genetică și clarificarea unor incertitudini taxonomice precum și evidențierea a noi considerente relative la istoria evolutivă a acestor rase din cadrul subfamiliei *Bovidae*, însumând un număr de 4 capitole.

Scopul cercetării a fost acela de a cuantifica variabilitatea genetică a raselor de bovine Sură de Stepă și Pinzgau și de a stabili relațiile de filogenie în cadrul subfamiliei *Bovinae*.

Planul de obiective a implicat parcurgerea mai multor etape de cercetare:

1. ***Cuantificarea variabilității genetice a populațiilor de bovine din cele două rase, prin parcurgerea următoarelor etape:***

➤ identificarea haplotipurilor prezente atât în populația de bovine Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu-Iași cât și a populației din rasa Pinzgau din cadrul S.C.D.C.B, Târgu-Mureș, prin analiza secvențelor nucleotidice ale citocromului b și a regiunii de control mitocondrial d-loop;

➤ estimarea diversității genetice intra și interpopulaționale pe baza rezultatelor obținute în urma analizei celor doi markeri mitocondriali.

2. *Analiza filogenetică a raselor prin parcurgerea următoarelor etape:*

➤ compararea ratei de evoluție a markerilor mitocondriali studiați, cu rata de evoluție a genomului mitocondrial complet, atât la nivel de rasă, specie cât și la nivel de gen, prin analiza secvențelor genice rezultate în urma secvențierii;

➤ impactul markerilor mitocondriali în estimarea timpului de divergență.

Realizarea obiectivelor propuse în cadrul acestei cercetări a fost posibilă prin efectuarea unor analize în cadrul laboratoarelor specializate atât din țară cât și din străinătate.

În vederea cuantificării diversității genetice, au fost efectuate o serie de analize în cadrul *Laboratorului de Genetică Moleculară* al Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași. Pentru secvențierea markerilor mitocondriali citocrom b și d-loop, probele de ADN au fost purificate și pregătite pentru a fi trimise în cadrul unui laborator specializat din Amsterdam-Olanda, "*Macrogen-Europe*" iar secvențele de ADN obținute au fost trimise în format electronic, sub forma unor fișiere de tip FASTA și a unor cromatograme specifice fiecărei secvențe analizate.

Pentru analiza secvențelor genice ale citocromului b și ale regiunii de control mitocondrial d-loop au fost utilizate o serie de programe de analiză genetică, enumerate și prezentate în continuare.

✚ Secvențierea produșilor PCR: secvențiere tip SANGER în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară al Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași și în cadrul Laboratorului *Macrogen-Europe* din Olanda;

✚ Alinierea cromatogramelor și corectarea secvențelor brute utilizând programul DNA Baser;

✚ Analiza secvențelor:

- ✓ Aliniere - programul Mega X;
- ✓ Model de substituție – programul jModelTest;
- ✓ Rețea de haplotipuri – programul PopArt;
- ✓ Construcția arborilor filogenetici de tipul NJ-Neighbor Joining, ML– maximum likelihood - programul SeaView;
- ✓ Genetică populațională – programele DnaSP 5.10 și R.

Analiza pedigree

Evaluarea diversității genetice a rasei de bovine Sură de Stepă pe baza analizei pedigree a fost realizată pe un număr de 171 indivizi.

Datele au fost mai întâi evaluate pentru fiecare individ și apoi utilizate pentru a calcula: intervalul între generații (L), gradul de rudenie (fIBD), gradul de rudenie nativă (fIBD | N), native genome equivalent (NGE), coeficientul de consangvinizare (F), dimensiunea efectivă a populației (Ne), diversitatea genetică, contribuția nativă bazată pe pedigree (NPED), contribuția genetică a altor rase și selecția optimă a contribuției, utilizând pachetul R optiSel (Wellmann, 2019).

Populația de bovine din rasa Sură de Stepă din cadrul S.C.D.C.B., Dancu a fost mărită în 2002, prin inseminarea in vitro a unui număr de 19 femele, utilizând material seminal de la 11 tauri. Strămoșii masculi folosiți pentru a construi toate cele 9 linii genetice, au fost indivizi de rasă pură, cu pedigree și fenotip specific Surei de Stepă. Pe de altă parte, exemplarele de sex feminin au prezentat diferite grade de incertitudine în ceea ce privește statutul lor de rasă pură, unele dintre ele având caracteristici nespecifice rasei.

Inițial, dimensiunea populației a înregistrat o fază de creștere accentuată, cu un maximum de 88 indivizi identificați în anul 2007, urmând apoi o fază scurtă de scădere a numărului de exemplare (perioada 2007-2009) iar din 2010 este stabilă la aproximativ 58 de indivizi.

În general, raportul naștere-deces a fost pozitiv, cu o rată medie a natalității de 8,3 indivizi/an și o rată medie a mortalității de 6 indivizi/an. Durata medie de viață a fost de doar 6,4 ani însă intervalul mediu între generații a fost destul de ridicat (12,75).

Valoarea ridicată a intervalului dintre generații este influențată de vârsta femelelor, care variază între 0 - 24 ani, în timp ce masculii au o durată de viață de cel mult 5 ani. Pe baza datelor din pedigree au fost urmărite complet un număr de 6 generații pentru femele și 5 pentru masculi. Integritatea informațiilor din pedigree a arătat valori relativ ridicate ($<0,85$) până la generația a doua, atât pentru masculi cât și pentru femele.

Coefficientul de consangvinizare a prezentat valori cuprinse în intervalul 0 - 0,39, în timp ce media a fost de 3,82% pentru indivizii vii și 2,3% per total indivizi analizați.

Populația actuală prezintă un nivel de diversitate genetică de ~ 94%. Contribuția genetică a indivizilor cu origini neclare sau cu aspect nespecific al rasei a scăzut treptat, în timp, de la ~ 50% în 2002 la mai puțin de 3% în 2019.

Analiza secvențelor genice

Ca urmare a secvențierii genei citocrom b și a regiunii de control mitocondrial d-loop s-a constatat faptul că acești markeri prezintă o relevanță deosebită în evidențierea diferențelor genetice și stabilirea filogeniei dintre indivizii unei specii.

Prin analiza și interpretarea secvențelor genice specifice rasei de bovine Sură de Stepă, s-au identificat un număr de 4 haplogrupuri, cu diferite frecvențe (T1-3%, T2-19%, T3/T4-62% și P'QT-16%), în care au fost încadrați cei 32 indivizi studiați. Identificarea haplogrupului P'QT în urma analizei secvențelor nucleotidice, indică faptul că acest haplogrup este de tip ancestral, fiind specific bourului (*Bos taurus primigenius*), din care a evoluat această rasă de bovine.

În cadrul acestui haplogrup au fost identificați un număr de 5 indivizi, reprezentând un procent de 16% din totalul exemplarelor analizate, care ar putea fi utilizați în cadrul selecției, pentru încrucișări, cu scopul de a conserva rasa în stare pură.

Expansiunea demografică și spațială are la bază modelul de clacul *Mismatch distribution* și arată distribuția numărului de diferențe, identificate între perechile de haplotipuri. De regulă, această distribuție poate fi unimodală (specifică populațiilor care

au suferit fie o expansiune demografică recentă, fie o expansiune spațială, caracterizată de un grad mare de migrație) sau multimodală (în cazul populațiilor aflate în echilibru demografic). Pentru populația de bovine Sură de Stepă a rezultat o distribuție multimodală atât în urma analizei secvențelor nucleotidice ale citocromului b cât și a regiunii de control mitocondrial d-loop.

În cazul rasei Pinzgau, ca și în cazul rasei Sură de Stepă, s-a identificat frecvența haplogrupurilor pentru cei 24 indivizi, atât pe baza analizei secvențelor genice ale citocromului b cât și a regiunii de control mitocondrial d-loop. De asemenea, s-a calculat proporția celor patru baze azotate pentru ambele secvențe precum și coeficientul de specificitate pe baza raportului A+T/G+C. S-a urmărit în ansamblu, dinamica ratei de evoluție a celor doi markeri mitocondriali și expansiunea demografică a grupului de indivizi analizați.

Ca urmare a analizei secvențelor genice, spre deosebire de rasa Sură de Stepă, în cazul rasei Pinzgau au fost identificate 3 haplogrupuri, având frecvențe diferite (T1, T2 și T3). Cei 24 de indivizi au fost distribuiți în haplogrupurile corespunzătoare, astfel: 18 indivizi aparținând haplogrupului T3 (75%), 5 indivizi identificați în cadrul haplogrupului T2 (21%) și un singur individ reprezentant pentru haplogrupul T1 (4%).

În primele capitole s-a discutat despre dovezile arheologice care atestă faptul că bovinele au trecut prin două mari evenimente de domesticire, respectiv, primul eveniment care a avut loc în sud-vestul Asiei, dând naștere bovinelor cu descendență în *Bos primigenius* și al doilea din care a evoluat zebu sau *Bos indicus* (Loftus et. al., 1994; Loftus et. al., 1999; Troy et. al., 2001).

Analizele ADN-ului mitocondrial la rasele de bovine din Europa au demonstrat apartenența majorității acestora la haplogrupul T, cu o estimare a timpului de divergență de ~ 16 mii ani. Acest haplogrup T, este divizat în două subclade surori, respectiv T1-T2-T3 (în care au fost identificați o mare parte din indivizii aparținând celor două rase) și subcladele T4-T5 (Mannen et. al., 2004; Bradley et. al., 1996).

Haplogrupurile T și P'QT, identificate la rasa Sură de Stepă au fost implicate în același proces de domesticire în Cornul Abundenței (Achilli et. al., 2008; Achilli et. al., 2009).

Conform expansiunii demografice, evidențiată pe baza modelului de calcul *Mismatch distribution* se poate observa distribuția numărului de diferențe ce se regăsesc între perechile de haplotipuri. Indivizii din rasa Pinzgau au prezentat o distribuție de tip multimodal, rezultată atât din analiza secvențelor nucleotidice ale citocromului b cât și a regiunii de control mitocondrial d-loop, ceea ce arată un echilibru demografic.

Rezultatele investigațiilor privind cuantificarea variabilității genetice a celor două rase de bovine Sură de Stepă și Pinzgau din România și identificarea relațiilor filogenetice în cadrul subfamiliei *Bovinae* au condus la formularea următoarelor concluzii:

- cuantificarea spectrofotometrică a ADN-ului total a validat cantitativ și calitativ etapa de izolare a acidului dezoxiribonucleic făcând posibilă trecerea la următoarele etape de analiză;

- prin migrarea produșilor PCR în gel de agaroză, s-a constatat faptul că nu au avut loc amplificări nespecifice și nici nu au avut loc contaminări iar primerii utilizați pentru amplificare au prezentat un grad ridicat de specificitate pentru cei doi markeri mitocondriali analizați;

- ca urmare a secvențierii markerilor mitocondriali citocrom b și d-loop s-a constatat faptul că aceștia prezintă o relevanță deosebită în evidențierea diferențelor genetice și stabilirea filogeniei dintre indivizii unei specii;

- analizele moleculare efectuate privind diversitatea genetică, expansiunea demografică și spațială a celor două rase de bovine din România, demonstrează sustenabilitatea spațio-temporală a indivizilor, aspect favorabil procesului de reintroducere în libertate a acestora;

- cercetările filogenetice efectuate au demonstrat că pentru a cuantifica corect relațiile filogenetice din cadrul subfamiliei *Bovinae* și pentru a estima timpul de divergență, nu este suficientă folosirea unui arbore cu suport topologic ridicat, acesta nefiind capabil să estimeze corect vârsta cladelor ci analiza unor markeri mitocondriali concatenați și analizați individual pentru rasele de bovine incluse în studiu;

- prin investigațiile moleculare efectuate s-a constatat că gena citocrom b reprezintă markerul mitocondrial cel mai capabil să evalueze corect relațiile filogenetice din cadrul subfamiliei *Bovinae*.

Rezultatele cercetării, pot contribui la îmbunătățirea programului de conservare al raselor Sură de Stepă și Pinzgau și la completarea informațiilor actuale cu privire la diversitatea genetică a acestora, reprezentând un instrument valoros pentru eforturile privind conservarea acestor rezerve de gene aflate în pericol de extincție.

Păstrarea genofondului acestor rase necesită aplicarea unor măsuri suplimentare și alocarea unor resurse financiare considerabile. Pentru a concepe strategii de conservare adecvate și eficiente, trebuie luate în considerare o serie de cunoștințe exacte despre toți indivizii existenți în cadrul unei populații. Prin urmare, se recomandă cercetări suplimentare, care să aibă în vedere analiza genomului mitocondrial complet, a cromozomului Y (partea paternă), a microsateleților, analiza ADN-ului extras de la fosile sau resturi osoase aparținând taurinelor *Bos taurus*, asigurând astfel o mai bună înțelegere a structurii genetice reale și a istoriei anterioare a populației studiate.

Un aspect important pentru a asigura un program eficient de conservare al celor două rase îl reprezintă conservarea materialului genetic prin criogenarea probelor (țesut și ADN genomic) și crearea unei baze de date cu probele arhivate, parametrii fenotipici și profilul genotipic al fiecărui individ, astfel încât să se asigure propagarea rasei.

Analizele de genetică moleculară, aplicarea biotehnicilor de reproducere și crearea unei bănci de material genetic vor contribui la o conservare activă și la eliminarea raselor din lista celor aflate în pericol de extincție precum și la dezvoltarea orientărilor specifice, sub aspect economic, genetic și cultural.