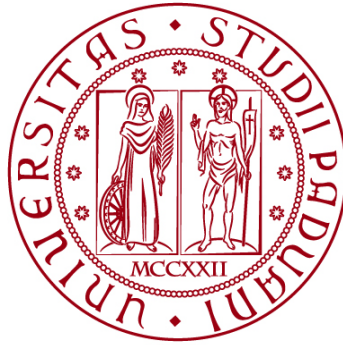


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Sviluppo di marcatori microsatellite in lampreda padana
(*Lampetra zanandreae*)**

**Tutor: Prof. Alessandro Grapputo
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Elena Catelan
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Giada Unizzi

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Genetica di popolazione e di conservazione.....	3
1.2 Biologia della specie <i>Lampetra zanandreae</i> (lampreda padana).....	4
1.3 Marcatori microsatelliti.....	6
1.4 Sviluppo dei metodi di isolamento dei microsatelliti.....	7
2. SCOPO DELLA TESI	10
3. MATERIALI E METODI	11
3.1 Investigazione del genoma.....	11
3.2 Disegno dei Primers.....	11
3.3 Estrazione del DNA.....	12
3.4 Preparazione del campione.....	12
3.4.1 Diluizione del DNA.....	12
3.4.2 Preparazione dei Primers.....	12
3.4.3 Preparazione della reazione di PCR	12
3.5 Amplificazione mediante PCR	13
3.6 Elettroforesi su gel.....	13
3.6.1 Preparazione del gel di agarosio	13
3.6.2 Corsa su gel	13
3.7 Analisi dei dati	13
3.8 Utilizzo del QIAGEN Multiplex PCR Kit	13
3.8.1 Preparazione della reazione di PCR	14
3.8.2 Amplificazione mediante PCR	14
3.9 Elettroforesi su gel.....	14
3.10 Analisi dei dati	14
4. RISULTATI	15
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	17
6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	20

1. INTRODUZIONE

1.1 Genetica di popolazione e di conservazione

La genetica delle popolazioni studia come un tratto varia sia nel tempo, attraverso le generazioni, che nello spazio in un gruppo di individui. La genetica di popolazione valuta sia la struttura genetica del tratto, sia le forze che la modificano attraverso le frequenze alleliche e genotipiche caratteristiche delle popolazioni studiate (Laurentin Táriba, 2023).

Il principio dell'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) è alla base della genetica delle popolazioni. Questo afferma che in qualsiasi popolazione in panmixia, in assenza di mutazione, migrazione, selezione e deriva genetica, le frequenze alleliche e genotipiche rimangono le stesse generazione dopo generazione. Nello specifico la migrazione e la mutazione determinano la variabilità genetica, mentre la selezione, naturale o artificiale, e la deriva genetica permettono l'ereditarietà o l'eliminazione dei cambiamenti introdotti nella generazione (Laurentin Táriba, 2023).

La genetica di popolazione è in grado di fornire un'interpretazione della variazione genetica, capire e fare predizioni sulla cause dell'evoluzione e permette di elaborare strategie per la gestione delle specie a rischio di estinzione (Hurt e Hedrick, 2004).

Proprio di questo si occupa in modo specifico la genetica di conservazione che è l'applicazione della genetica per diminuire il rischio di estinzione di popolazioni e specie a rischio. Prende in considerazione i fattori genetici che causano rarità e pericolo di estinzione, come la consanguineità e la perdita di diversità genetica, nelle specie e si occupa di risolvere le incertezze a livello tassonomico (Frankham, 2019).

Una delle sue applicazioni più importanti rimane la sua capacità di consentire una descrizione dei modelli e comprensione dei processi che hanno dato origine all'attuale stato di rischio di estinzione in cui verte la popolazione o specie considerata. In futuro, il punto cruciale sarà che queste competenze siano applicate nelle decisioni riguardanti proprio la gestione delle specie a rischio. A tal proposito, avere un approccio in cui si preservano le aree ecologiche o geografiche in cui la specie vive risulta essere più efficiente nella conservazione a lungo termine, rispetto a quello basato solo sul mantenimento della singola specie (DeSalle e Amato, 2004).

Come detto in precedenza, la genetica della conservazione impiega i marcatori molecolari, i quali permettono la stima dei parametri fondamentali collegati alla conservazione, come l'effettiva dimensione della popolazione, la presenza dell'effetto del fondatore o collo di bottiglia, l'origine degli individui e della popolazione, il livello di consanguineità tra i membri della popolazione e il flusso genico (Hurt e Hedrick, 2004). Inoltre possono essere utilizzati anche per l'identificazione delle specie, unità evolutivamente significative (ESU) e unità di

gestione (MU) (Hurt e Hedrick, 2004), che hanno un ruolo nel decidere la priorità di conservazione (DeSalle e Amato, 2004).

I marcatori molecolari possono essere impiegati anche per ricavare le relazioni storiche e geografiche tra i gruppi estinti, quindi possibilmente fornire informazioni utili per l'analisi delle relazioni di quelli contemporanei (Hurt e Hedrick, 2004).

1.2 Biologia della specie *Lampetra zanandreai* (lampreda padana)

Gli Agnatha, o pesci senza mascella, sono stati il primo gruppo di vertebrati marini la cui linea evolutiva si è discostata da quella che diede origine ai Gnatostomi, vertebrati con mandibola, circa 550 milioni di anni fa. Dei gruppi che vi appartenevano, solo le lamprede (Petromyzontiformes) e le missine (Myxinoformes) non si sono completamente estinte (Conlon, 2013). Si tratta di organismi molto antichi che possono fornire informazioni significative sulla storia evolutiva dei vertebrati, in particolare sull'evoluzione del loro genoma. I diversi studi sul DNA degli Agnata, infatti, mostrano caratteristiche a loro uniche come il riarrangiamento programmato del genoma durante la fase iniziale dell'embriogenesi e il possesso di recettori immunitari diversi da quelli dei Gnatostomi (Smith et al. 2010).

Le lamprede (Petromyzontiformes) sono vertebrati acquatici che non presentano mascelle, dotati di un corpo somigliante a quello di un'anguilla, con un'unica narice inserita tra gli occhi e sette paia di aperture branchiali laterali esterne ben visibili. A livello della bocca, posseggono un disco orale succhiante con strutture, simili a denti, sporgenti, affilate e cornee, utilizzate per aderire al substrato o, nelle specie parassite, alla preda (Rüber et al., 2023). Presentano 2 famiglie localizzate nell'emisfero meridionale, i Geotriidae (un genere, due specie) e i Mordaciidae (un genere, tre specie), e una famiglia nell'emisfero settentrionale, i Petromyzontidae (otto generi, oltre 40 specie) (Rüber et al., 2023).

La lampreda padana, *Lampetra zanandreai*, è stata descritta per la prima volta grazie a campioni raccolti in nord Italia, prevalentemente in provincia di Vicenza, nord-est Italia, e dal fiume Ticino, nella zona di Pavia (Vladykov, 1955). Si tratta di una specie endemica della Regione Padana, pertanto la ritroviamo sul versante alpino del bacino del Po, in Veneto, in Friuli-Venezia Giulia e anche nell'Appennino marchigiano, a livello del Fiume Potenza (Zerunian, 2004). È stata trovata anche in Svizzera, Slovenia, Croazia e Bosnia ed Erzegovina. Inoltre, in Italia è stata anche identificata una specie definita "upper Po", alcuni chilometri sopra Torino, che differisce dalla *L. zanandreai* vera e propria a livello genetico (Rüber et al., 2023).

La lampreda padana è un organismo non parassita di acqua dolce, filtratore del fondale con sviluppo indiretto mediante larve ammocete. La vita larvale dura circa quattro o cinque anni, dopo di che avviene la metamorfosi, da agosto a ottobre, e si ha la degenerazione del sistema digerente dell'organismo, pertanto, gli adulti

non sono in grado di nutrirsi e utilizzano l'energia immagazzinata nelle riserve corporee durante lo stadio larvale. Gli individui adulti vivono dai sei agli otto mesi e la morte sopraggiunge in seguito alla riproduzione, da gennaio a giugno, e la successiva deposizione delle uova (Negro et al., 2023).

Le lamprede preferiscono habitat caratterizzati da velocità e profondità dell'acqua molto precise e da substrati costituiti da granelli di piccole dimensioni con un contenuto organico basso. Di conseguenza la probabilità di trovare questa specie è maggiore nei fiumi con migliori condizioni ecologiche, chimiche e idrologiche (Negro et al., 2023).

La *Lampetra zanandreai* rientra tra le specie a rischio di estinzione, come elencato negli allegati II e V della Direttiva Habitat 92/43/CEE (Comunità Economica Europea), nell'Appendice II e III della Convenzione CEE di Berna e nella IUCN (Unione Internazionale per la Conservazione della Natura, Lista rossa delle specie minacciate, IUCN, 2010).

In particolare nella Direttiva è indicata tra le "specie animali e vegetali d'interesse comunitario la cui conservazione richiede la designazione di zone speciali di conservazione" (all. II) e tra le "specie animali e vegetali d'interesse comunitario il cui prelievo nella natura e il cui sfruttamento potrebbero formare oggetto di misure di gestione" (all. V) (Zerunian, 2004).

Per conservare questa specie le azioni necessarie riguardano, in primo luogo, la gestione della qualità dei corsi d'acqua, il controllo del livello di inquinanti presenti e dello stato delle popolazioni nel loro ambiente naturale. A tal proposito sarebbe utile la creazione di aree protette fluviali. Ricerche sulla biologia ed ecologia collegate all'endemismo padano sono altrettanto indispensabili per la sua conservazione (Zerunian, 2004).

Inoltre, studiare e conoscere l'habitat delle larve ammocete dovrebbe essere la base di tutte le strategie per avere un miglioramento nella conservazione della specie, in quanto la maggior parte del suo ciclo vitale è trascorso come larva, sola fase in cui si nutrono (Negro et al., 2023).

In conclusione la lampreda padana è una specie appartenente ad una linea molto antica, con un enorme potenziale di interesse per via della sua posizione all'interno della linea di sviluppo dei vertebrati, la sua distribuzione biogeografica ed il suo stato di conservazione (Negro et al., 2023).



Figura 1. Immagine di *Lampetra zanandreai*

http://www.fishbiosystem.ru/cyclostomata/Petromyzontidae/Lampetra_zanandreai2.html

1.3 Marcatori microsatelliti

I microsatelliti o ripetizioni di sequenze semplici (SSR) sono motivi ripetuti in tandem di 1-6 nucleotidi presenti sia nelle regioni non codificanti che in quelle codificanti di tutti i genomi procarioti ed eucarioti analizzati fino ad oggi (Zane et al. 2002).

Nelle regioni codificanti portano alla comparsa di ripetizioni a livello delle sequenze amminoacidiche e ciò ha delle conseguenze nella regolazione dell'espressione genica. Nella regione del promotore, invece, è l'attività trascrizionale che viene influenzata. Mentre nelle regioni non codificanti sia la regolazione genica, sia la trascrizione e anche gli eventi ricombinanti subiscono gli effetti dei microsatelliti (Senan et al., 2014).

La caratteristica che gli contraddistingue è l'elevato livello di polimorfismo in termini di lunghezza, ovvero il numero di ripetizioni in tandem varia frequentemente e, di conseguenza, la lunghezza della ripetizione è soggetta a mutamenti. Ciò sembrerebbe dovuto, con maggiore probabilità, a eventi di slittamento (Zane et al. 2002) ed errori nella correzione che possono verificarsi durante la replicazione del DNA (Selkoe e Toonen, 2006).

Le ripetizioni delle sequenze microsatelliti variano solitamente tra le 5 e 40 volte, talvolta però sono anche in numero maggiore. Le ripetizioni di dinucleotidi, trinucleotidi e tetranucleotidi sono scelte più frequentemente per gli studi di genetica molecolare. In particolare perché le ripetizioni dinucleotidiche rappresentano la maggior parte dei microsatelliti per molte specie (Selkoe e Toonen, 2006) mentre le ripetizioni di trinucleotidi ed esanucleotidi sono più probabili nelle regioni codificanti perché non causano slittamento del frame di lettura (Selkoe e Toonen, 2006). Le ripetizioni di mononucleotidi, invece, sono meno affidabili a causa di problemi nella loro amplificazione, mentre le ripetizioni più lunghe sono meno presenti nel genoma e mancano dati sulla loro evoluzione (Selkoe e Toonen, 2006).

Il DNA che circonda un locus microsatellite è chiamato "flanking region", regione fiancheggiante; queste regioni hanno generalmente sequenze conservate, ovvero identiche, tra individui della stessa specie e, talvolta, di specie diverse, perciò un particolare locus microsatellite può essere identificato confrontando le sue sequenze fiancheggianti.

Una specifica coppia di primer o oligonucleotidi, ovvero sequenze brevi di DNA, può essere progettata per legarsi alle regioni fiancheggianti di uno specifico locus microsatellite per ottenere la sua amplificazione mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR) (Selkoe e Toonen, 2006).

I microsatelliti sono impiegati in moltissimi campi come potenti marcatori molecolari per la loro elevata variabilità. Si sono dimostrati essere uno strumento molto significativo per la mappatura del genoma in molti organismi (Zane et al. 2002), la preparazione di mappe genetiche e la mappatura comparativa tra

genomi di organismi diversi (Senan et al., 2014). Ulteriori applicazioni riguardano diverse aree, tra cui gli studi forensi e sul DNA antico, la genetica delle popolazioni, la conservazione e gestione delle risorse biologiche (Zane et al. 2002), l'analisi e la stima del grado di parentela in gruppi o individui strettamente correlati (Senan et al., 2014).

I microsatelliti, sono così ampiamente utilizzati poiché sono molto vantaggiosi rispetto agli altri marcatori genetici; ad esempio, data la loro lunghezza (100–300 pb) possono essere amplificati sebbene il DNA sia soggetto ad certo livello di degradazione e sono ereditati in modo mendeliano (Selkoe e Toonen, 2006).

Ulteriori vantaggi dei marcatori microsatelliti sono la trasmissione co-dominante (gli eterozigoti possono essere distinti dagli omozigoti), la natura locus-specifica, altamente polimorfica e ipervariabile, un elevato contenuto di informazioni e abbondanza relativa con copertura uniforme del genoma, con tasso di mutazione più elevato rispetto alla media del genoma (Abdul-Muneer, 2014).

Inoltre, poter impiegare più set di marcatori microsatellite in un'unica reazione di PCR (multiplexing dei marcatori) (Senan et al., 2014), ovvero la possibilità di poter amplificare un gran numero di loci in un colpo solo, è un'altra caratteristica che li rende più vantaggiosi rispetto ad altri marcatori (Abdul-Muneer, 2014).

Gli SSR presentano, però, anche molti svantaggi; il più rilevante è che, nella gran parte delle specie mai studiate prima, devono essere isolati de novo, quindi l'impiego dei cosiddetti "primer universali", realizzati sulla base di sequenze conservate in specie vicine, non è possibile. Ciò riguarda soprattutto quelli localizzati in regioni non codificanti in cui la sostituzione dei nucleotidi ha una probabilità maggiore rispetto alle regioni codificanti (Zane et al. 2002).

Altri svantaggi includono la comparsa di bande ombra o "stutter", la presenza di alleli nulli (alleli esistenti ma che non vengono osservati utilizzando i test standard), l'omoplasia e troppi alleli in specifici loci che richiederebbero una dimensione del campione molto elevata per essere analizzati (Abdul-Muneer, 2014).

In conclusione, lo studio dei marcatori microsatellite fornisce importanti informazioni sulla variabilità genetica e sulla struttura della specie analizzata, che permetteranno il miglioramento della sua gestione e conservazione (Abdul-Muneer, 2014).

1.4 Sviluppo dei metodi di isolamento dei microsatelliti

Per l'isolamento dei microsatelliti, tradizionalmente, si parte da una libreria genomica parziale delle specie d'interesse. Il primo passo prevede la frammentazione del DNA genomico di alta qualità con enzimi di restrizione o sonicazione. L'enzima di restrizione è scelto secondo il tipo di estremità coesive che genera, la media delle lunghezze dei frammenti di DNA che si vogliono ottenere e il numero delle ripetizioni dei microsatelliti desiderati. Successivamente il DNA frammentato viene selezionato sulla base delle sue

dimensioni per ottenere frammenti piccoli (300–700 bp) ed è legato a un vettore plasmidico comune, in maniera diretta o in seguito alla legatura a specifici adattatori. Questo è inserito in cellule batteriche che lo tramettono mediante duplicazione e danno origine a migliaia di cloni ricombinanti, che potranno essere sottoposti a uno screening per ricercare le sequenze microsatelliti. Questo screening per i cloni positivi, ovvero che contengono microsatelliti, viene effettuato mediante ibridazione Southern (Southern blotting) con sonde contenenti ripetizioni, dopo aver tamponato le colonie batteriche su membrane di nylon. Dopo l'identificazione dei cloni contenenti ripetizioni, bisogna sequenziarli con il metodo Sanger e basandosi sulle sequenze delle regioni fiancheggianti gli SSR, vengono progettati primer specifici e le condizioni della PCR vengono ottimizzate per consentire l'amplificazione di ciascun locus in diversi individui appartenenti alla stessa popolazione.

Mediante questa strategia si può ottenere un tasso di cloni positivi tra il 12% e meno del 0,04%, percentuale piuttosto bassa rispetto ad altri metodi. Si possono avere i migliori risultati in taxa caratterizzati da un'alta frequenza di microsatelliti (Zane et al. 2002).

I metodi e le strategie per l'isolamento dei microsatelliti si sono evoluti con il passare del tempo; se all'inizio lo screening delle librerie e sviluppo di librerie arricchite erano i metodi prediletti, ora si è giunti all'estrazione genomica, creazione di database EST e utilizzo di tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (Novelli et al., 2013).

Per produrre una libreria arricchita di microsatelliti è necessario, appunto, arricchire i frammenti di DNA microsatellite. Per fare ciò è molto utile un metodo chiamato "Fast isolation by AFLP of sequences containing repeats (FIASCO)", introdotto da Zane et al. (2002).

FIASCO si basa sulla tecnica "Amplified fragment length polymorphism (AFLP)", perciò il DNA genomico viene simultaneamente frammentato con un enzima di restrizione, e legato a specifici adattatori oligonucleotidici. Gli adattatori fungono da modello per l'amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR). I frammenti amplificati vengono ibridati con una sonda biotinilata di DNA ripetuto e catturati selettivamente da sfere rivestite con streptavidina. Il DNA separato dal complesso sfere-sonda viene fatto precipitare e poi amplificato.

È molto utilizzato per la sua semplicità d'uso ed efficacia, con una capacità di identificare cloni contenenti ripetizioni di dinucleotidi che si aggira tra il 50 e il 95% (Rikalainen, 2013).

Gli SSR possono essere sviluppati a partire da due tipi di risorse di sequenza: il DNA genomico, che genera SSR genomici, e i tag di sequenza espressa (EST), che generano EST-SSR o SSR genici. Esistono dei database EST, i quali permettono di sviluppare SSRs a partire dai EST (Jiang et al., 2020).

La procedura prevede una ricerca all'interno dei database EST per cercare EST contenenti SSR che serviranno per progettare primers specifici per il locus

microsatellite desiderato. Gli EST-SSR hanno un minore livello di polimorfismo rispetto agli SSR genomici, ma presentano alcuni vantaggi rilevanti, ovvero possono ottenuti con selezione elettronica in maniera rapida e sono abbondanti in regioni con molti geni. Inoltre, sono utilizzati per mappare i geni in maniera diretta poiché rappresentano la parte del genoma codificante, e hanno un livello maggiore di trasferibilità tra specie correlate trovandosi in regioni più conservate (Varshney et al., 2002). Con il progredire dei database, la disponibilità di EST è sempre maggiore e i marcatori EST-SSR possono essere ottenuti a costo basso e ciò potrà determinare il progredimento delle ricerche genomiche in molte specie (Jiang et al., 2020).

Un'altra strategia implica l'impiego di sequenze genomiche ottenute con le tecnologie di "Next-generation sequencing (NGS)" che consentono l'identificazione efficiente e il sequenziamento massiccio e in parallelo di singole molecole di DNA di un gran numero di loci SSR, con un costo e sforzo molto ridotti rispetto agli approcci tradizionali.

NGS sono approcci di seconda generazione nell'ambito del sequenziamento e sono a "lettura breve" perché utilizzano sequenze brevi individuali (Hu et al., 2021).

Un esempio è la tecnologia Illumina, con la quale avviene l'amplificazione clonale delle librerie di DNA tramite una "bridge amplification" PCR, prima del sequenziamento. Quest'ultimo si basa sulla lettura di nucleotidi fluorescenti: un dNTP fluorescente viene accoppiato ad una molecola terminatore reversibile ed è incorporato, mediante una DNA polimerasi, nella catena nucleotidica in formazione durante ogni ciclo di sequenziamento. Man mano che i cicli si susseguono il risultato è l'acquisizione di una immagine del segnale fluorescente dei singoli nucleotidi. Inoltre, NGS Illumina è in grado di svolgere il sequenziamento bidirezionale, che avviene in entrambe le estremità di una stringa di DNA, e genera dati di sequenziamento di alta qualità (Hu et al., 2021).

Più recentemente sono state sviluppate tecnologie di sequenziamento dette di terza generazione. Una di queste è la Oxford Nanopore Technology (ONT) che è definita tecnologia a "lettura lunga" poiché le lunghezze di lettura possono essere superiori a 10 kb (Hu et al., 2021). È uno strumento di grande rilevanza per la ricerca ambientale, che comprende anche la conservazione della biodiversità, così come per l'individuazione di patogeni (Lin et al. 2021).

Oxford Nanopore Technology (ONT) svolge il sequenziamento di molecole singole mediante nanopori, piccoli pori che agiscono come biosensori (Zheng et al., 2023). La prima fase prevede la preparazione della libreria: i frammenti di DNA vengono riparati, indipendentemente dal fatto che siano stati tagliati o meno, mediante un complesso DNA-proteina con una polimerasi o elicasi. La seconda fase è il processo di sequenziamento (Lin et al. 2021): su una pellicola resistiva sono generati un certo numero di nanopori, che rappresentano l'unico canale di collegamento tra i due lati dove ci sono due soluzioni ioniche. Un singolo filamento di acidi nucleici,

che può essere DNA o RNA, dotato di carica negativa si sposta da un lato all'altro attraverso il nanoporo. Ciò è possibile perché è soggetto all'azione di un campo elettrico stabile, generato dal sequenziatore di nanopori, alle cui estremità sono posizionati degli elettroni. Il processo con cui le molecole di acido nucleico passano attraverso i nanopori è guidato da proteine motrici, che permettono l'apertura del doppio filamento e che possono controllare la velocità di attraversamento (Zheng et al., 2023). Infine l'ultima fase è il "basecaller" (Lin et al. 2021): durante il passaggio dei nucleotidi la carica del nanoporo si modifica, quindi il flusso di elettroni sulla membrana resistiva subisce un cambiamento. Ogni filamento determina un flusso di elettroni unico. Il sequenziatore di nanopori, quindi riceve e registra il segnale elettronico per implementarlo in un programma matematico che permette di determinare il tipo di base e avere il risultato del sequenziamento (Zheng et al., 2023).

2. SCOPO DELLA TESI

La *Lampetra zanandreae* è una specie di vertebrato acquatico endemico della regione padana a rischio di estinzione, pertanto si rivela necessario mettere in atto strategie efficaci per la sua conservazione (IUCN, 2010). Si tratta di un organismo di particolare interesse poiché, essendo appartenente al gruppo degli Agnati, una linea evolutiva molto antica, ha una posizione centrale nella storia evolutiva dei vertebrati e una distribuzione biogeografica rilevante (Negro et al., 2023).

Per preservare la specie è necessario conoscerne la biologia, ma anche condurre studi sulla genetica di popolazione e, soprattutto, di conservazione. Quest'ultima, infatti, ha un ruolo fondamentale nelle decisioni riguardanti le specie a rischio e impiega come strumenti i marcatori molecolari, tra cui i microsatelliti che per la loro elevata variabilità sono molto utili (DeSalle e Amato, 2004).

Questo lavoro di tesi è stato realizzato allo scopo di isolare dei marcatori microsatelliti nella lampreda padana a partire dal sequenziamento del suo genoma. Mediante l'utilizzo di campioni provenienti da Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Piemonte e Marche, sono stati effettuati dei test di PCR (Polymerase Chain Reaction) per determinare quali primers potessero amplificare in modo soddisfacente alcune regioni microsatelliti precedentemente selezionate. Questi marcatori molecolari potranno poi essere impiegati, in futuro, per studi di genetica di popolazione e conservazione. Per quanto riguarda la *Lampetra zanandreae*, è la prima volta che viene svolto questo tipo di analisi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Investigazione del genoma

Su un assemblaggio preliminare del genoma della lampreda padana ottenuto dal sequenziamento Nanopore nel nostro laboratorio, è stato impiegato il software MISA (Thiel et al., 2003) per cercare corte sequenze ripetute (SSRs) che potessero costituire putativi loci microsatelliti. Le seguenti specifiche del software sono state implementate:

- definition (unit_size, min_repeats): 2-8 3-6 4-6 5-5 6-5
- interruptions (max_difference_between_2_SSRs): 100
- GFF: false

La ricerca con MISA ha prodotto 2191 SSRs. Da alcune di queste scelte a caso, escludendo SSRs presenti sulla stessa reads, si è iniziato a provare a disegnare coppie di primers.

3.2 Disegno dei Primers

Per ogni locus microsatellite è stata disegnata una coppia di primers (Forward e Reverse) specifica per l'amplificazione del locus, utilizzando il software Geneious Prime (BioMatters Ltd.) che impiega il pacchetto Primer3 (Koressaar e Remm, 2007; Untergasser et al., 2012).

Per ricavare i primer da utilizzare sono stati impostati alcuni parametri:

- lunghezza del prodotto di amplificazione: inizialmente impostata con un range ampio, ed eventualmente ridotta per ricavare ampliconi con lunghezze in intervalli specifici;
- calcolo della temperatura di melting: SantaLucia 1998;
- dimensione dei primer: 18 - 22 b, con ottimale a 20;
- temperatura di annealing: 58 - 62°C, con ottimale a 60;
- %GC: 50 - 60, con ottimale a 65;
- temperatura massima dei dimeri di primer (Max Dimer Tm): 25°C;
- massima stabilità del 3' (Max 3' Stability): 9;
- GC clamp: 1;
- Max Poly-X: 2.

I primers sono stati controllati con il software FastPCR.

Gli ampliconi, contenenti i primers specifici disegnati, sono stati differenziati in quattro gruppi, basandosi sulla loro lunghezza in paia di basi (pb). Gli ampliconi avevano un range tra 95 e 410 pb.

Ogni gruppo doveva contenere 4 loci di dimensioni diverse in modo da poter essere distinguibili con lo stesso fluoroforo in un sequenziatore capillare ABI.

Pertanto sono state disegnate 23 coppie di primers per 23 loci totali su cui testare l'amplificazione.

3.3 Estrazione del DNA

È stato estratto il DNA di 4 lamprede padane originarie di Piemonte, Marche, Friuli-Venezia Giulia e Veneto, i cui campioni saranno per comodità rispettivamente nominati come: *L. zan 2.3*, *L. zan 11*, *L. zan 17* e *L. zan 23*.

L'estrazione è avvenuta prelevando una parte delle branchie e seguendo le istruzioni del DNeasy Blood e Tissue Kits (QIAGEN).

Sono state ricavate 4 eluizioni per ogni lampreda, la cui qualità è stata analizzata mediante lo spettrofotometro Nanodrop, per determinare la presenza di contaminanti, mentre la concentrazione del DNA è stata misurata mediante il fluorimetro Qubit. Le concentrazioni, espresse in ng/μl, spaziavano tra 40 ng/μl e 292 ng/μl.

3.4 Preparazione del campione

3.4.1 Diluizione del DNA

Una eluizione per ogni lampreda è stata diluita con acqua sterile e deionizzata per raggiungere la concentrazione finale di DNA di 10 ng/μl e 20 ng/μl, che sono state utilizzate, rispettivamente, per testare i campioni di Primers con la EasyTaq® DNA Polymerase e il QIAGEN Multiplex PCR kit.

3.4.2 Preparazione dei Primers

I primers ordinati sono stati risospesi singolarmente aggiungendo una quantità specifica di acqua sterile e deionizzata per avere una concentrazione stock di 100 μM. Poi sono stati diluiti 1:10 aggiungendo 10 μl di primer insieme a 90 μl di acqua, sia per il Forward che per il Reverse, generando così le soluzioni di lavoro a 10 μM.

3.4.3 Preparazione della reazione di PCR

Per la reazione di PCR è stato utilizzato un mix di reazione (master mix) contenente i reagenti riportati nella Tabella 1 sottostante, con relativi volumi, per ottenere un volume finale di 20 μl.

Tabella 1. Dati relativi alle sostanze utilizzate per realizzare il mix di reazione

Componenti	Concentrazione iniziale	Volume per campione
Nuclease-free H ₂ O	-	12,4 μl
EasyTaq® Buffer	10x	2 μl
dNTPs	2.5 mM	1,6 μl
Forward Primer	10 μM	0,4 μl
Reverse Primer	10 μM	0,4 μl
EasyTaq® DNA Polymerase	5 U/μl	0,2 μl
DNA	10 ng/μl	3 μl

Per ogni primer è stato preparato anche un campione di controllo negativo in cui il DNA è stato sostituito da 3 µl di H₂O.

3.5 Amplificazione mediante PCR

L'amplificazione dei campioni per tutti i loci è stata eseguita con una temperatura di annealing di 55°C.

Gli steps della PCR consistevano in:

- Stage 1: 1 ciclo a 94°C per 3 minuti;
- Stage 2: 35 cicli: 94°C per 30 secondi (denaturazione), 55°C per 30 secondi (annealing), 72°C per 1 minuto (estensione).
- Stage 3: 1 ciclo di 72°C per 5 minuti

3.6 Elettroforesi su gel

3.6.1 Preparazione del gel di agarosio

I campioni di DNA amplificato e il controllo negativo sono stati visualizzati mediante una corsa in gel di agarosio al 1,2%.

Il gel di agarosio è stato preparato unendo 40 ml di TAE1X, 0,48 g di Agar e 0,6 µl EuroSafe Nucleic Acid Staining Solution (20,000x).

3.6.2 Corsa su gel

All'interno di ogni pozzetto vengono depositati 6 µl prelevati dalla soluzione ottenuta mischiando i 20 µl di prodotto di PCR e 6 µl di 6× DNA Loading Buffer, che era parte del kit della EasyTaq® DNA Polymerase.

La corsa durava 45 minuti a 40 V, il primo pozzetto conteneva 6 µl insieme al marcatore di peso molecolare Ladder 1 Kb.

Il gel è stato visualizzato mediante un transilluminatore a UV e fotografato.

3.7 Analisi dei dati

La qualità dei campioni è stata valutata in base alle foto del gel con score:

- positivo, se risultava una banda chiara;
- negativo, se non c'era alcun risultato, ovvero nessuna banda evidente;
- "smear", se era presente una sbavatura dell'amplificato.

Delle 23 coppie di primers testate con EasyTaq® DNA Polymerase, 18 sono state etichettate con score positivo e, pertanto, si è passati ai test con un'altra tipologia di polimerasi per ottimizzare l'amplificazione in Multiplex con una polimerasi adatta.

3.8 Utilizzo del QIAGEN Multiplex PCR Kit

Identificati i 18 Primers, sono stati fatti test dei singoli ampliconi utilizzando il QIAGEN Multiplex PCR Kit, il quale presenta un tipo di polimerasi con specificità

diverse rispetto alla classica EasyTaq® DNA Polymerase, quindi si è potuto perfezionare il profilo di amplificazione per le future amplificazioni in multiplex dei loci.

Il 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix contiene: HotStarTaq® DNA Polymerase, Multiplex PCR Buffer e dNTP Mix.

Per utilizzare questa polimerasi sono stati impiegati i campioni di DNA delle lamprede di Piemonte e Friuli-Venezia Giulia, ovvero *L. zan* 2.3 e 17 con concentrazione 20 ng/μl, poiché erano i due che avevano dato risultati migliori nei test precedenti.

3.8.1 Preparazione della reazione di PCR

Per la PCR è stato utilizzato il QIAGEN Multiplex PCR Kit, perciò il mix di reazione conteneva i valori qui riportati in Tabella 2, per ottenere quindi un volume finale di 10μl.

Tabella 2. Dati relativi alle sostanze utilizzate per realizzare il mix di reazione

	Concentrazione iniziale	Volume per campione
RNase-free H ₂ O	-	2 μl
Forward Primer	10 μM	0,5 μl
Reverse Primer	10 μM	0,5 μl
QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	2x	5 μl
DNA	20 ng/μl	2 μl

Per ogni primer è stato preparato anche un controllo negativo in cui il DNA è stato sostituito da 2 μl di H₂O.

3.8.2 Amplificazione mediante PCR

L'amplificazione di tutti i loci è stata eseguita con una temperatura di annealing di 57°C. Gli steps della PCR consistevano in:

- Stage 1: 1 ciclo a 95°C per 15 minuti;
- Stage 2: 35 cicli: 95°C per 45 secondi (denaturazione), 57°C per 30 secondi (annealing), 72°C per 45 secondi (estensione).
- Stage 3: 1 ciclo di 60°C per 30 minuti

3.9 Elettroforesi su gel

La preparazione del gel è stata eseguita come descritto precedentemente ma con l'uso di un Ladder a 100 pb come marcatore di peso molecolare.

3.10 Analisi dei dati

I dati sono stati analizzati come descritto nel test precedente.

4. RISULTATI

Dall'osservazione della corsa in gel di agarosio dei 23 loci amplificati con l'utilizzo della EasyTaq® DNA Polymerase e con temperatura di annealing di 55°C, sono stati ricavati questi risultati: 18 loci hanno avuto una valutazione con score positivo mentre 5 loci sono stati scartati poiché consistevano in uno "smear" come il n° 831 riportato in Figura 2, oppure non hanno amplificato come, ad esempio, il n°138 in Figura 3.

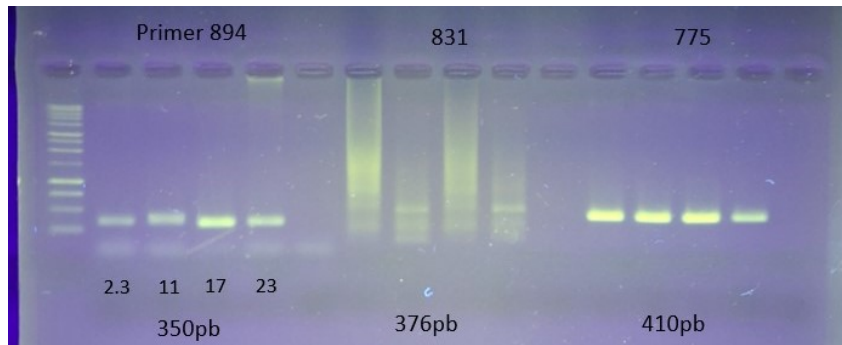


Figura 2. Fotografia del gel di agarosio in cui si vede il risultato di tre loci (894, 831 e 775) microsatellite amplificati con EasyTaq® DNA Polymerase. I cinque campioni per ogni set di primers sono nell'ordine *L. zan* 2.3, 11, 17, 23 e controllo negativo. I Primers n° 894 e 775 danno risultati positivi mentre il n° 831 è considerato uno "smear". Nel primo pozzetto è stato fatto correre il marcatore di peso molecolare Ladder 1Kb.

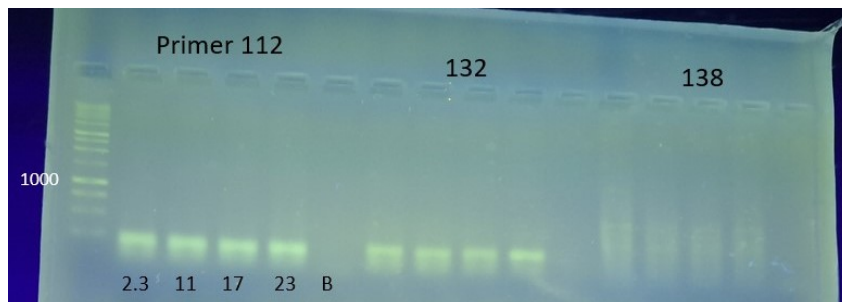


Figura 3. Fotografia del gel di agarosio in cui è mostrato il risultato della corsa dei loci n° 112, 132 e 138 amplificati con EasyTaq® DNA Polymerase. I cinque campioni per ogni locus sono rispettivamente *L. zan* 2.3, 11, 17, 23 e il controllo negativo. I Primers n° 112 e 132 hanno dato buon risultato mentre il 138 è risultato negativo, ed è stato scartato. Nel primo pozzetto è stato caricato il marcatore di peso molecolare Ladder 1Kb.

Gli ampliconi con valutazione "smear" sono stati amplificati con la medesima polimerasi aumentando ulteriormente la temperatura di annealing nel termociclatore, tuttavia non abbiamo ottenuto risultati migliori e questi loci sono stati esclusi dallo studio. Alla fine del primo test di amplificazione siamo, rimasti con 18 loci, 2 in più del nostro target di 16 loci.

Questi 18 loci sono stati amplificati in singolo con il QIAGEN Multiplex PCR Kit, la cui polimerasi ha un profilo di amplificazione diverso da quella del test precedente, con i seguenti risultati nella corsa su gel: 13 ampliconi hanno dato un prodotto più intenso alla temperatura di annealing di 57°C e 3 con temperatura di annealing di 55°C, per un totale di 16 loci.

I 13 loci potranno, quindi, essere amplificati in un unico mix di reazione utilizzando il QIAGEN Multiplex PCR Kit, mentre i 3 loci potranno essere sottoposti allo stesso protocollo ma in una diversa reazione di amplificazione mix, date le differenti temperature di annealing.

Due loci non hanno dato risultati di amplificazione soddisfacenti con il QIAGEN Multiplex PCR Kit. Si tratta dei loci n° 163 in Figura 4 e n° 189 in Figura 5, che erano stati amplificati con la EasyTaq® DNA Polymerase dando valutazione positiva.

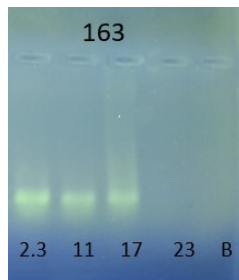


Figura 4. Fotografia del gel di agarosio in cui si vede il risultato della corsa del locus 163 amplificato con EasyTaq® DNA Polymerase. I cinque campioni per questo set di primers sono nell'ordine *L. zan* 2.3, 11, 17, 23 e controllo negativo. Il Primer 163 dà risultato positivo.

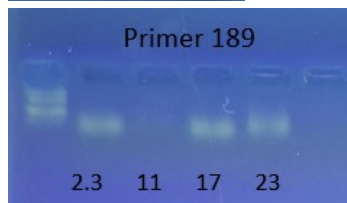


Figura 5. Fotografia del gel di agarosio in cui si vede il risultato della corsa del locus 189 amplificato con EasyTaq® DNA Polymerase. I cinque campioni per questo set di primers sono nell'ordine *L. zan* 2.3, 11, 17, 23 e controllo negativo. Il Primer 189 dà risultato positivo.

Questi due loci sono stati successivamente amplificati in multiplex utilizzando la EasyTaq® DNA Polymerase con temperatura di annealing a 55°C, con la quale avevamo ottenuto una buona amplificazione in singolo, ma in multiplex hanno mostrato interazioni tra loro, come si nota in Figura 6, con un gran numero di bande. Essi, pertanto, dovranno essere amplificati in singolo con la EasyTaq® DNA Polymerase, per poter essere impiegati in studi futuri.

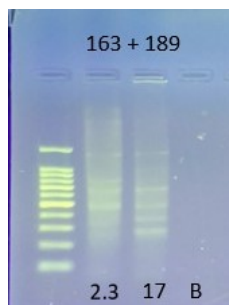


Figura 6. Fotografia del gel di agarosio in cui si vede il risultato della corsa del mix di Primer n° 163 e 189 amplificati con EasyTaq® DNA Polymerase. I due campioni per questo mix di primers sono nell'ordine *L. zan* 2.3, 17 e controllo negativo. Il Primers mostrano più di una banda quindi interagiscono tra loro formando coppie aspecifiche.

I dati relativi ai 18 loci microsatellite amplificati con successo, mediante EasyTaq® DNA Polymerase con temperatura di annealing di 55°C, e i rispettivi primers sono riportati nella Tabella 3 qui di seguito.

Tabella 3. Loci microsatellite amplificati con successo e relativi primers utilizzati per l'amplificazione, tipo di ripetizione (2 = dinucleotidiche, 3 = trinucleotidiche) e la lunghezza dell'amplicone.

Locus name	Primer Forward	Primer Reverse	Type of repeat	Size (bp)
tig00000011	CGCTAGCAAGAAGTCACAG	GGATGCTACTCACTAACAGC	2	95
tig00001094	TTGTCTCTGGTTGCACTCG	CAGACAAGTTACAGTCACGG	2	128
tig00000499	CGTCTCGGCTGAATTACC	TCTTACGCCATGCATTGC	3	134
tig00000108	GTTCTGATTGACTCGGTG	CAATTCAGAGGTCGACAGC	3	138
tig00001156	ACCGGCGTGTAAATCATC	GACCAGTTCAAGTACACGTC	2	149
tig00000112	GAGTCTTGTATCCGTGATGC	CAGTCACTCCAGATGCAAC	2	211
tig00000040	TGGCGAGATCTAACTACCTC	TACCTCTAGCCTATGTGCTG	2	226
tig00000132	CCATGCAAGCTGGTTAACC	ATCGTGGTCAAGCGGTAAC	2	240
tig00000453	GACTGTCATATCAACTCGCC	GATCTCCGTAACGCTGTTG	2	242
tig00000312	GACCAATTATCTGACCACCG	GGCAACAAGTGGATTCTC	2	246
tig00000306	TCAGACTGATTCGACCTAGG	CTCCAATCTAATTGCAGCC	2	280
tig00000591	CGGAGTAAGACTGATGGCC	GAGAGACACACACTGTTC	3	294
tig00000368	CACCAATGAGTCCGACATC	GCTTCAAGGTACGAACTGC	3	304
tig00000894	CTCTCTCAACAGAATCTCGC	CACAGTATTACGGAATGGCG	3	350
tig00001288	CAACTAGATGGCGCATAC	CCATAACAGCATCCACGAAG	3	374
tig00000775	CTTGCTCGTCTCCTAATCC	GAACGTGCCTTGCTATTG	2	410
tig00000163	TGGACATCTGTGAGGACG	CCAAGCAGCAGTCGATAAG	3	287
tig00000189	CTGAGAGAGAAGGATCGGAG	GAGTGGTCACATGTACAAGC	3	342

Le due righe riportate **rosso** indicano i due loci che non possono essere amplificati mediante multiplex ma devono essere amplificati in singolo con la EasyTaq® DNA Polymerase con temperatura di annealing a 55°C.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

In questa tesi sono stati isolati con successo 16 loci microsatelliti appartenenti alla specie *Lampetra zanandreae* (lampreda padana). Per ottenere questo risultato, il DNA della lampreda è stato precedentemente sequenziato con metodo Nanopore (ONT) e sono state individuate alcune sequenze microsatelliti e le loro sequenze fiancheggianti. Proprio su quest'ultime sono stati progettati primers, con dimensione tra 18 e 22 pb, che si differenziano tra loro per la lunghezza degli ampliconi in cui sono contenuti. Questi primers sono stati provati come descritto in precedenza su campioni di DNA di lamprede con diversa origine e potranno essere impiegati in futuro, ad esempio per studi sulla genetica di popolazione e conservazione della specie.

I microsatelliti (SSR) sono marcatori molecolari il cui isolamento è stato per molto tempo basato su tecniche laboriose di arricchimento di regioni ripetute, clonaggio e sequenziamento Sanger dei cloni. Per queste ragioni la disponibilità di marcatori

microsatelliti è stata per lungo tempo limitata in un gran numero di specie (Novelli et al., 2013).

Il metodo tradizionale prevede di partire proprio da una ricerca nella libreria genomica parziale delle specie d'interesse; metodo laborioso ed efficace in taxa con un'alta frequenza di microsatelliti o per scopi in cui ottenere un numero relativamente basso di microsatelliti è sufficiente (Zane et al. 2002). È anche possibile lo sviluppo di librerie di microsatelliti arricchite che possono essere generate mediante il metodo FIASCO, molto usato poiché non richiede attrezzature o abilità di laboratorio specifiche (Rikalainen, 2013). Oppure utilizzare databases EST, per esempio, impiegando quindi sequenziamenti già depositati per cercare sequenze contenenti SSR (Varshney et al., 2002).

In tutti questi metodi la progettazione dei primer è una componente chiave per lo sviluppo dei marcatori SSR e con il progredire delle nuove tecnologie, sta diventando molto più semplice rispetto che in passato. In particolare i metodi di sequenziamento, che permettono di ricavare direttamente le sequenze nucleotidiche, sono molto efficaci nella ricerca delle regioni fiancheggianti dei microsatelliti, dove possono essere disegnati i primers.

Le tecniche di sequenziamento usate attualmente sono il sequenziamento a "lettura breve", che rientra nelle tecnologie NGS di seconda generazione, e a "lettura lunga", che non richiedono necessariamente l'amplificazione in PCR del DNA e sono tecnologie di sequenziamento di terza generazione.

Le tecnologie di seconda generazione NGS, come Illumina, forniscono dati di sequenziamento altamente accurati, con un sequenziamento pair-end molto preciso con un tasso di errore dello 0,1% (principalmente errori di sostituzione, raramente inserimenti/eliminazioni).

Tuttavia sono presenti anche delle limitazioni come tempi di esecuzione lunghi, difficoltà con l'assemblaggio delle reads sequenziate de novo, l'identificazione di isoforme di trascrizione, nel caso di sequenziamenti trascrittomici, e l'individuazione delle varianti strutturali. Inoltre, per la natura delle tecnologie a lettura breve, i dati di sequenziamento su lunghi tratti di DNA richiedono l'assemblaggio delle reads che presenta notevoli sfide soprattutto in presenza di variazioni strutturali del genoma, regioni con bassa complessità e strutture ripetute, come i microsatelliti (Hu et al., 2021).

Con il sequenziamento mediante Illumina HiSeq 2500, ad esempio, si possono ottenere pair-reads di 2x150 pb (Henson et al. 2012), ovvero 300 pb in tutto ma nelle quali sono compresi anche gli adattatori specifici permettono il sequenziamento in entrambe le direzioni (Buermans 2014).

Il marcatore microsatellite, quindi, dovrà trovarsi più o meno al centro della reads per poter essere circondato da regioni fiancheggianti sufficienti per la progettazione dei primers e non dover essere frammentato in reads diverse. Infatti, le reads grezze, che contengono SSR e flanking regions insieme, sono

preferibili in quanto diminuisce il rischio di errori. Inoltre, con questo tipo di sequenziamento, non è possibile individuare se le sequenze SSR sono in linkage equilibrium finché non si è assemblato il genoma oppure fatta l'analisi su tutti i campioni.

Le tecnologie di terza generazione, come ONT, consentono finestre di lettura molto più lunghe del DNA nativo, consentendo una valutazione diretta e uniforme della sequenza analizzata (Hu et al., 2021). Sono utili per individuare le regioni genomiche contenenti sequenze lunghe e ripetute, come i microsatelliti, consentono lo studio delle variazioni strutturali e permettono l'assemblaggio del genoma de novo in maniera più semplice (Kono e Arakawa, 2019).

Permettono una migliore caratterizzazione dei geni polimorfici, il rilevamento e la corretta individuazione dei riarrangiamenti strutturali, la raccolta dei dati in tempo reale e hanno un costo minore. Inoltre, poiché viene utilizzato direttamente il DNA nativo, eventuali errori introdotti durante il processo di amplificazione vengono eliminati (Hu et al., 2021), rispetto alle tecnologie dipendenti dalla PCR (Pugh, 2023).

Pertanto hanno superato molte delle limitazioni delle tecnologie di seconda generazione, tra cui la possibilità di scoprire subito la presenza di linkage equilibrium tra i microsatelliti più vicini.

Queste tecnologie presentano, però, anche dei limiti, come la capacità di ottenere DNA ad alto peso molecolare ed una minore accuratezza (92-93%) nella lettura, che limita l'identificazione delle varianti a singolo nucleotide (Hu et al., 2021).

In conclusione, data l'utilità e versatilità dei microsatelliti, negli anni sono stati sviluppati svariati metodi per il loro isolamento e sequenziamento. Molti di questi, però, non possono essere sempre applicati, in particolare, in specie per cui non si hanno ancora conoscenze genomiche.

Queste difficoltà possono essere oggi facilmente superate grazie ai nuovi metodi di sequenziamento a "lettura lunga", come ONT. Quest'ultimo è molto efficiente in quanto non richiede tempi o costi elevati e utilizza il DNA nativo, per cui non è sempre necessaria l'amplificazione del campione. In particolare, realizzando reads molto lunghe è possibile ricavare flanking regions più lunghe, di conseguenza primers più efficaci per ottenere amplificazioni PCR in multiplex di molti loci SSR, migliorando così i metodi per l'utilizzo dei questi marcatori per gli studi sulle popolazioni delle specie a rischio.

6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/691759>
- Buermans, H. P. J. e Den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Conlon, J. M. (2013). Evolution in Action. In *Handbook of Biologically Active Peptides* (pp. 1842–1849). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00252-9>
- DeSalle, R. e Amato, G. (2004). The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 5(9), 702–712. <https://doi.org/10.1038/nrg1425>
- Frankham, R. (2019). Conservation Genetics. In *Encyclopedia of Ecology: Vol. Volume 1* (second edition, pp. 382–390). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10559-7>
- Henson, J., Tischler, G. e Ning, Z. (2012). Next-Generation Sequencing and Large Genome Assemblies. *Pharmacogenomics*, 13(8), 901–915. <https://doi.org/10.2217/pgs.12.72>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D. e Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Hurt, C. e Hedrick, P. (2004). Conservation genetics in aquatic species: General approaches and case studies in fishes and springsnails of arid lands. *Aquatic Sciences*, 66(4), 402–413. <https://doi.org/10.1007/s00027-004-0726-5>
- IUCN. (2010). *Lampetra zanandreae*: Freyhof, J.: The IUCN Red List of Threatened Species 2011: E.T60798A136560770 [Dataset]. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2006.RLTS.T60798A12401347.en>
- Jiang, Y., Xu, S., Wang, R., Zhou, J., Dou, J., Yin, Q. e Wang, R. (2020). Characterization, validation, and cross-species transferability of EST-SSR markers developed from *Lycoris aurea* and their application in genetic evaluation of *Lycoris* species. *BMC Plant Biology*, 20(1), 522. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02727-3>
- Kono, N. e Arakawa, K. (2019). Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics. *Development, Growth e Differentiation*, 61(5), 316–326. <https://doi.org/10.1111/dgd.12608>

- Koressaar, T. e Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289–1291. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>
- Laurentin Táriba, H. E. (2023). Population Genetics. In H. E. Laurentin Táriba, *Agricultural Genetics* (pp. 137–166). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-37192-9_11
- Lin, B., Hui, J. e Mao, H. (2021). Nanopore Technology and Its Applications in Gene Sequencing. *Biosensors*, 11(7), 214. <https://doi.org/10.3390/bios11070214>
- Negro, G., Marino, A., Forte, S., Lo Conte, P., Bo, T., Fenoglio, S. e Vezza, P. (2023). Ecological notes on an endemic freshwater lamprey, *Lampetra zanandreae* (Vladykov, 1955). *The European Zoological Journal*, 90(2), 556–567. <https://doi.org/10.1080/24750263.2023.2226680>
- Novelli, V. M., Cristofani-Yaly, M., Bastianel, M., Palmieri, D. A. e Machado, M. A. (2013). Screening of Genomic Libraries. In S. K. Kantartzi (A c. Di), *Microsatellites* (Vol. 1006, pp. 17–24). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_2
- Pugh, J. (2023). The Current State of Nanopore Sequencing. In K. Arakawa (A c. Di), *Nanopore Sequencing* (Vol. 2632, pp. 3–14). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2996-3_1
- Rikalainen, K. (2013). Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats. In S. K. Kantartzi (A c. Di), *Microsatellites* (Vol. 1006, pp. 57–66). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_4
- Rüber, L., Gandolfi, A., Foresti, D., Paltrinieri, L., Splendiani, A. e Seehausen, O. (2023). Phylogenetic and biogeographic history of brook lampreys (*Lampetra: Petromyzontidae*) in the river basins of the Adriatic Sea based on DNA barcode data. *Ecology and Evolution*, 13(9), e10496. <https://doi.org/10.1002/ece3.10496>
- Selkoe, K. A. e Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615–629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
- Senan, S., Kizhakayil, D., Sasikumar, B. e Sheeja, T. E. (2014). Methods for Development of Microsatellite Markers: An Overview. *Notulae Scientia Biologicae*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.15835/nsb619199>
- Smith, J. J., Saha, N. R. e Amemiya, C. T. (2010). Genome Biology of the Cyclostomes and Insights into the Evolutionary Biology of Vertebrate Genomes. *Integrative and Comparative Biology*, 50(1), 130–137. <https://doi.org/10.1093/icb/icq023>

Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R. e Graner, A. (2003). Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 106(3), 411–422. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1031-0>

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. e Rozen, S. G. (2012). Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115–e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

Varshney, R., Thiel, T., Stein, N., Langridge, P. e Graner, A. (2002). In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cellular e molecular biology letters*, 7, 537–546.

Vladykov, V. D. (1955). *Lampetra zanandreae*, a New Species of Lamprey from Northern Italy. *Copeia*, 1955(3), 215. <https://doi.org/10.2307/1440464>

Zane L., Bargelloni, L. e Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x>

Zerunian, S. (2004). Pesci delle acque interne d'Italia. Quaderni di conservazione della natura, Vol. 20. Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio, Direzione conservazione della natura —Istituto Nazionale Fauna Selvatica. https://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/quaderni/conservazione-natura/files/6739_20_qcn_pesci_acque_int.pdf

Zheng, P., Zhou, C., Ding, Y., Liu, B., Lu, L., Zhu, F. e Duan, S. (2023). Nanopore sequencing technology and its applications. *MedComm*, 4(4), e316. <https://doi.org/10.1002/mco2.316>