



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



Università degli studi di Padova

Facoltà di Agraria

Dipartimento di Scienze Animali

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CONIGLI NANI DA PET E D'ALLEVAMENTO MEDIANTE L'UTILIZZO DI MARCATORI MOLECOLARI MICROSATELLITI

Relatore: Prof. Roberto Mantovani

Laureando: Alessandro Sturaro
Matr. N° 585109

ANNO ACCADEMICO 2009 – 2010

INDICE

| | |
|--|-----------|
| RIASSUNTO | 5 |
| ABSTRACT | 7 |
| 1. INTRODUZIONE | 9 |
| 1.1 STUDIO DI POPOLAZIONE | 9 |
| 1.1.1 Caratterizzazione genetica | 9 |
| 1.1.2 Diversità genetica | 10 |
| 1.1.3 Genetica di popolazione | 10 |
| 1.1.4 Struttura genetica delle popolazioni | 11 |
| 1.1.5 Misure del differenziamento genico tra popolazioni | 11 |
| 1.1.6 La legge di Hardy Weinberg | 13 |
| 1.1.7 Consanguineità ed accoppiamento | 13 |
| 1.2 STRUMENTI DI CARATTERIZZAZIONE GENETICA: I MARCATORI | 16 |
| 1.2.1 Marcatori genetici | 16 |
| 1.2.2 Marcatori morfologici | 17 |
| 1.2.3 Marcatori molecolari | 18 |
| 1.2.4 Tipologie di marcatori molecolari | 20 |
| 1.3 MICROSATELLITI | 23 |
| 1.3.1 Slippage dei microsatelliti | 23 |
| 1.3.2 Mutazioni | 23 |
| 1.3.3 Vantaggi e limiti dei microsatelliti | 24 |
| 1.4 I CONIGLI DA “PET” | 24 |
| 1.4.1 Origine | 24 |
| 1.4.2 Descrizione | 25 |
| 1.4.3 Anatomia e abitudini | 25 |
| 1.4.4 Commercio degli animali “pet” | 25 |
| 1.4.5 Marcatori molecolari e futuro dei conigli da “pet” | 26 |
| 2. OBIETTIVI | 27 |
| 3. MATERIALE E METODI | 29 |
| 3.1 Prelievo dei campioni di sangue e tessuto | 29 |
| 3.2 Estrazione del DNA da sangue e tessuto | 29 |
| a) estrazione di DNA da sangue di coniglio nano o “pet” | 29 |
| b) estrazione di DNA da tessuto di coniglio da carne (commerciale) | 30 |
| 3.3 Amplificazione dei loci microsatelliti | 30 |
| 3.4 Analisi Statistica | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE | 33 |
| 4.1 Variabilità genetica e caratteristiche dei loci microsatelliti | 33 |
| 4.2 Diversità genetica entro popolazione. | 33 |
| 4.3 Struttura della popolazione | 34 |
| 5. CONCLUSIONI | 35 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 37 |
| TABELLE | 39 |
| FIGURE | 42 |
| Ringraziamenti | 45 |

RIASSUNTO

Recentemente l'impiego dei marcatori molecolari si è molto diffuso nella caratterizzazione genetica di specie e razze di animali sia per la produzione zootecnica che negli animali da compagnia. Molti sono i lavori che si sono concentrati nella caratterizzazione genetica delle diverse razze delle specie di interesse zootecnico (Bovini, Suini, Ovi-Caprini, Equini, Avicoli e Cunicoli). Il coniglio Nano non è esattamente identificabile come una razza, ma sicuramente si caratterizza per una serie di elementi morfologici inerenti le dimensioni di alcune regioni corporee (testa, tronco), il colore del mantello ed il temperamento docile. L'enorme interesse che tale coniglio ha assunto in anni recenti come animale da compagnia ha fatto sì che molti dei requisiti tipici del coniglio nano "pet" (PET) stiano degradando sempre più verso forme di animali lontani dalla tipologia desiderata. Poiché in tale contesto zootecnico sono spesso incerte le origini e provenienze dei soggetti PET, la caratterizzazione genetica di soggetti appartenenti alla tipologia da compagnia potrebbe essere di estremo interesse in un mercato in crescita.

L'obiettivo di questo lavoro è stato lo sviluppo e l'applicazione di un panel di microsatelliti ad una popolazione di conigli PET e di conigli commerciali da carne impiegati come "reference".

La popolazione PET ($n = 128$) è stata sottoposta a prelievi di sangue da padiglione auricolare, mentre per la popolazione commerciale ($n = 32$) sono stati utilizzati campioni di tessuto muscolare ottenuto dalla macellazione degli animali. Le matrici organiche dei due tipi di conigli sono state sottoposte ad estrazione del DNA con procedure standardizzate e, previa ricerca in silico di un panel di 22 marcatori microsatelliti, i campioni di DNA sono stati sottoposti ad analisi delle frequenze alleliche dei marcatori mediante l'uso di sequenziatore. Ciò allo scopo di ottenere dei valori di livello di variabilità e diversità genetica tra i soggetti delle due sottopopolazioni.

La popolazione PET ha mostrato una maggiore diversità genetica (Allelic Richness, $AR = 4,2$) rispetto alla popolazione commerciale ($AR = 3,4$), ed ha inoltre evidenziato una deviazione significativa dall'equilibrio di H-W dovuta ad un eccesso di omozigoti ($FIS = 0,139$), mentre la popolazione commerciale ha evidenziato un eccesso di eterozigoti, probabilmente dovuta al fatto che i soggetti risultavano incroci terminali da carne. La differenziazione genetica tra le due sottopopolazioni è risultata elevata, con un indice F_{ST} pari a 0,137. La popolazione commerciale si è sempre separata chiaramente dalla PET, con un'elevata proporzione di appartenenza (0,929) e senza la presenza di admixture. Al contrario,

il gruppo PET ha mostrato una struttura di popolazione più complessa ed eterogenea con molti più individui di origine “mista”. In definitiva è stato possibile identificare tre diversi cluster genetici di coniglio PET, prova di una elevata variabilità e possibile degenerazione dell’uniformità richiesta per questo tipo di animale.

ABSTRACT

Recently the use of molecular markers it is very common in the genetic characterization of species and breeds of animals for livestock's production and in pets. Many studies have been focussed on the genetic characterization of different breeds of livestock species (cattle, pigs, sheep, goats, horses, poultry and rabbits). The dwarf's rabbit is not really identifiable as a race, but certainly characterized by a series of peculiar morphological elements of certain body region (head size, trunk length), the coat colour, and docile temperament. The enormous interest that this sort of rabbit has seen in recent years as pet animal (PET), has lead to an increasingly degradation of some specific traits belonging to typical dwarf's rabbit "pets" towards forms of animals away from the desired type. Within this context, livestock have often uncertain origin. Therefore, the genetic characterization of PET subjects belonging to this type could be of great interest in such a growing market.

The objective of this study was the development and application of a panel of microsatellites in a population of PET rabbits and commercial rabbits used for meat production as "reference". The population of PET ($n = 128$) was subjected to blood sampling from the ear vein, while for the commercial population ($n = 32$) samples of muscle tissue obtained from slaughtered animals, were used. Organic matrices of the two types of rabbits were subjected to DNA extraction by standardized procedures and, after *in silico's* research of a panel of 22 microsatellite's markers, DNA's samples were subjected to analysis of allele's frequencies of single markers through gene sequencing method. This in order to obtain the values of the genetic diversity level and variability among subjects belonging to the two subpopulations.

The PET's population showed greater genetic diversity (Allelic Richness, $AR = 4.2$) than the commercial's population ($AR = 3.4$), and showed a significant deviation from HW's equilibrium due to an excess of homozygotes ($F_{IS} = 0.139$). On the other hand, the commercial's population showed an excess of heterozygotes, probably due to the fact that subjects were terminal crosses for meat production. The differentiation's genetic between the two subpopulations was high, with an F_{ST} 's index equal to 0.137. the commercial's population has always clearly separated from the PET with a great proportion of membership (0.929) and without the admixture's presence. In contrast, the PET's group showed a population's structure more complex and heterogeneous with many more individuals of "mixed" origin. Last, it was possible to identify three different genetic's clusters of PET's rabbits as an evidence of the greater variability and possible degeneration of the uniformity required for this type of animal.

1. INTRODUZIONE

1.1 STUDIO DI POPOLAZIONE

1.1.1 Caratterizzazione genetica

“Caratterizzare” significa descrivere un carattere o una qualità di un individuo o una popolazione (1991, Merriam – Webster definition), ovvero analizzare le caratteristiche genetiche dell’individuo o di una popolazione mediante l’applicazione di tecniche di biologia molecolare.

Come vedremo in seguito l’uomo fin dall’antichità si è servito di ogni mezzo a sua disposizione per classificare o selezionare degli organismi (animali in questo caso) che potevano essere utili per la sua vita quotidiana.

Purtroppo con il tempo incroci incontrollati e manipolazioni hanno creato confusione e hanno portato alla diminuzione di caratteri o addirittura razze riducendoli in stato di estinzione.

Il World Watch List for Domestic Animal Diversity (WWL-DAD), giunto nel 2002 alla sua terza edizione, è un sistema di identificazione e monitoraggio delle razze domestiche del mondo a rischio di estinzione, messo a punto nell’ambito del progetto Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources della FAO.

L’obiettivo del WWL-DAD è quello di comunicare lo stato delle risorse genetiche animali facilitando gli interventi finalizzati a fermare o diminuire il trend negativo di erosione della diversità biologica animale, per ogni popolazione viene riportata una lunga serie di informazioni, dai nomi locali alla distribuzione, dallo stato delle popolazioni agli utilizzi principali degli animali, alla presenza o meno di piani di conservazione.

Alcuni studi dello stesso ente nel 2003 (Scheaf, B. (ed.) World Watch List for Domestic Animal Diversity . FAO 2003) hanno documentano la presenza di oltre 6300 razze di animali domestici appartenenti a 30 specie differenti, sviluppate secondo criteri di addomesticamento in sinergia con la selezione naturale e umana.

Questo documento probabilmente sottovaluta il reale numero di razze indigene sparse nei paesi sottosviluppati che sarebbero portatrici di geni favorevoli (serbatoio di variabilità genetica o risorse genetiche animali) e che restano da “decifrare” sia in termini genotipici che fenotipici.

Queste popolazioni hanno evoluto un adattamento unico al loro sistema di produzione agricola; la loro diversità genetica ha fornito materiale da riproduzione, ottimo per incroci controllati con le specie addomesticate di interesse agrario nei paesi sviluppati.

La caratterizzazione genetica, quindi può essere uno strumento vincente per analizzare la distribuzione di genotipi all'interno di una popolazione di interesse (magari indigena) e il risultato dei successivi incroci con razze addomesticate, attraverso lo stesso strumento, si può identificare e monitorare l'avvenuto fissaggio dei nuovi genotipi favorevoli o graditi promovendo di conseguenza il miglioramento genetico e lo sviluppo economico.

Obiettivo di questa tesi è la caratterizzazione genetica molecolare di un gruppo di conigli nani da "pet" al fine di studiare la diversità genetica, la struttura della popolazione e per confrontare quest'ultima con una popolazione commerciale di conigli da carne.

L'aumento della richiesta di conigli nani da "pet" nel mercato e il relativo aumento di allevatori e strutture di allevamento (e selezione genetica) hanno portato alla necessità di approfondire le conoscenze a livello genetico per lo sviluppo di applicazioni di monitoraggio della diversità genetica, dell'inbreeding ed eventualmente per la selezione.

1.1.2 Diversità genetica

La diversità genetica si riferisce alla variabilità del patrimonio genetico nell'ambito di una singola specie. Essa include le variazioni genetiche tra popolazioni distinte della stessa specie, e le variazioni genetiche all'interno di una stessa popolazione. La diversità genetica può essere misurata usando vari metodi basati sul DNA ed altre tecniche (World Conservation Monitoring Centre, 1992a).

La variazione genetica si verifica in popolazioni di organismi che si riproducono sessualmente mediante ricombinazione e, nei singoli individui, mediante mutazioni nei geni e nei cromosomi.

Il pool di variazioni genetiche presenti in una popolazione che si incrocia liberamente viene modellato dalla selezione naturale. La selezione fa sì che alcuni attributi genetici vengano favoriti rispetto ad altri, come risultato si hanno modifiche della frequenza di geni all'interno della popolazione.

1.1.3 Genetica di popolazione

La genetica di popolazione è una branca della genetica che analizza la costituzione genetica delle popolazioni in termini quantitativi (frequenze alleliche e genotipiche) e valuta le

modalità con le quali le caratteristiche genetiche sono trasmesse alla progenie (evoluzione temporale) ed il variare delle stesse in relazione al territorio (distribuzione spaziale).

La genetica di popolazione è rappresentata da una componente teorica che si avvale di metodi statistici, ed una maggiormente empirica che rileva e quantifica la diversità genica con scopi conoscitivi della storia naturale delle popolazioni, o del grado di biodiversità per scopi di conservazione.

1.1.4 Struttura genetica delle popolazioni

Nelle popolazioni naturali è importante conoscere la struttura genetica per studiare la variabilità delle stesse al fine di formare correttamente ipotesi e approcci di mantenimento/salvaguardia della biodiversità della popolazione.

Tra le popolazioni di quasi tutte le specie esistono vari livelli di differenziamento genico.

Per descrivere la struttura genetica delle popolazioni vengono impiegati essenzialmente 2 tipi di metodi:

- I metodi diretti, basati sulle osservazioni dei movimenti degli animali, dei gameti o dei marcatori molecolari, che forniscono però visioni ristrette del flusso genico nel tempo e nello spazio, dal momento che occasionali migrazioni ad ampio raggio sono molto difficili da osservare e i movimenti osservati di animali, gameti, o marcatori potrebbero non avere significato da un punto di vista evolutivo se gli individui osservati non si riproducono nel nuovo sito.
- I metodi Indiretti, basati sulla distribuzione spaziale osservata degli alleli, genotipi, o caratteri fenotipici, che permettono di fare ipotesi sui livelli storici o sui patterns del flusso genico che hanno dato origine al pattern attuale di variabilità genetica. Questi metodi sono, in altre parole, sensibili ai rari eventi passati che hanno influenzato l'attuale struttura delle popolazioni. I metodi indiretti di stima del flusso genico si basano su attese di equilibrio derivate dai modelli teorici di struttura di popolazioni.

1.1.5 Misure del differenziamento genico tra popolazioni

F-Statistics

Wright (1951) ha introdotto un metodo per descrivere la genetica di popolazioni di organismi diploidi in termini di tre coefficienti F, utilizzati per allocare la variabilità genetica a livello di popolazione totale (T), suddivisioni (S) e individui (I).

FIS = è una misura della deviazione dalle proporzioni dell'equilibrio Hardy-Weinberg delle sottopopolazioni

FIT = è una misura della deviazione come la precedente solo riguardante la popolazione totale di individui.

Per entrambi i coefficienti valori positivi indicano un difetto di eterozigoti e viceversa un eccesso, essi vengono spesso chiamati genericamente indici di fissazione.

FST = è una misura del differenziamento genico tra sottopopolazioni ed è sempre positivo, esso può essere interpretato come una misura della varianza standardizzata delle frequenze alleliche tra sottopopolazioni.

Questi tre coefficienti sono legati dalla relazione: $F_{ST} = (F_{IT} - F_{IS}) / (1 - F_{IS})$

Misure dell'eterosi necessarie per la F-Statistics.

H_I = eterozigotità osservata (proporzione di eterozigoti) in una sottopopolazione.

H_S = eterozigotità attesa in una sottopopolazione. Se esistono i differenti alleli in un locus in una sottopopolazione (p_i è la frequenza dell' i -simo allele)

H_T = eterozigotità attesa nell'ipotesi di "accoppiamento casuale" dell'intera meta-popolazione (p_i medio = frequenza media dell' i -simo allele).

L'indice F_{ST} permette di valutare quanto siano differenziate le sottopopolazioni. Formalmente, esso misura l'esistenza di un deficit di eterozigoti nella meta-popolazione dovuto a differenziamento tra le sottopopolazioni.

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

F_{IS} indica la presenza di inbreeding nelle sottopopolazioni attraverso il confronto tra H_I e H_S (come valori medi tra le sottopopolazioni in esame):

$$F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$$

Quindi F_{IS} misura se esiste, in media, un deficit o un eccesso di eterozigoti nella sottopopolazione.

F_{IT} indica quanto la struttura di popolazioni abbia influenzato l'eterozigosi media nella popolazione totale:

$$F_{IT} = (H_T - H_I) / H_T$$

1.1.6 La legge di Hardy Weinberg

Una popolazione all'equilibrio è un'entità astratta, non soggetta ad evoluzione. Per comprendere quali forze indicano l'evoluzione nelle popolazioni naturali è necessario esaminare le caratteristiche di una popolazione non soggetta a evoluzione.

Nel 1908 H. Hardy e W. Weinberg definirono "popolazione in equilibrio" una popolazione all'interno della quale né le frequenze alleliche né la distribuzione dei genotipi mutano col succedersi delle diverse generazioni.

Non modificandosi le frequenze degli alleli, non si avrebbe, pertanto, evoluzione.

Una popolazione resta in equilibrio solo se in essa si verificano alcune condizioni restrittive:

- non devono verificarsi mutazioni;
- non deve verificarsi un flusso genico tra popolazioni;
- la popolazione deve essere teoricamente infinita;
- non si deve verificare selezione naturale, ovvero tutti i genotipi hanno le stesse capacità riproduttive ed adattative;

Se queste condizioni sono rispettate, le frequenze alleliche entro una popolazione rimarranno costanti per un periodo di tempo indefinito. Tale equilibrio è espresso dalla seguente equazione:

$$p + q = 1 \text{ da cui } (p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

In questa equazione p indica la frequenza di un allele e q indica la frequenza dell'altro allele; la somma ($p + q$) deve essere sempre uguale a 1 (cioè il 100% degli alleli di quel particolare gene nel pool genico).

L'espressione p^2 indica la frequenza di individui omozigoti per un allele, q^2 la frequenza di individui omozigoti per l'altro allele e $2pq$ la frequenza degli eterozigoti.

Il venir meno di queste condizioni determina un cambiamento delle frequenze alleliche ovvero un'evoluzione. Sono pochissime le popolazioni che soddisfano le condizioni e che si possono considerare perfettamente in equilibrio.

1.1.7 Consanguineità ed accoppiamento

È noto che gli allevatori cercano di migliorare le caratteristiche dei propri animali domestici utilizzando come riproduttori i soggetti "migliori" di ogni generazione con accoppiamenti di individui tra loro parenti in modo da ottenere, attraverso un certo numero di generazioni, un "pool" genetico con le caratteristiche desiderate. Per raggiungere una omogeneità di "tipo",

L'allevatore opera con accoppiamenti in consanguineità. Questo metodo di accoppiamento, detto anche inincrocio o inbreeding provoca, a livello genetico, un aumento dell'omozigosi. Con una scelta opportuna degli accoppiamenti, infatti noi possiamo aumentare o diminuire il grado di omozigosi di una popolazione, o viceversa lasciarlo inalterato, come si verifica con gli accoppiamenti casuali. Si parla di accoppiamento casuale quando la probabilità di accoppiamento tra individui è indipendente dalla loro costituzione genetica e dipende dalla frequenza dei genotipi stessi. Secondo la legge di Hardy-Weinberg in una popolazione con accoppiamenti casuali, le frequenze alleliche e quelle genotipiche non cambiano.

Le frequenze vengono invece cambiate da 4 cause principali:

- a) **mutazioni:** cambiamenti spontanei del genoma, ereditabili, che originano nuove capacità genetiche nelle popolazioni. In genere hanno una frequenza molto bassa;
- b) **migrazioni:** movimento di individui all'interno di una popolazione più grande;
- c) **selezione naturale:** capacità degli individui di sopravvivere e riprodursi nei loro ambienti;
- d) **deriva genetica:** cambiamenti casuali delle frequenze alleliche che avvengono in tutte le popolazioni più in particolare in quelle piccole;

Fra queste cause quella che assume maggior importanza e significato nelle variazioni genetiche è la selezione naturale che può essere definita come la riproduzione differenziale di varianti genetiche alternative.

La selezione naturale sta alla base dei processi di adattamento in quanto alcuni individui, portatori di determinate varianti, hanno una maggiore capacità di sopravvivenza e di riprodursi rispetto i portatori di altre varianti.

Questo valore selettivo o valore adattativi chiamato anche "fitness relativa", è la probabilità di un genotipo di riprodursi, cioè una misura della sua efficacia riproduttiva.

La selezione naturale, pertanto agisce sulla sopravvivenza (resistenza alle malattie, risposte immunitarie, ecc.). Oltre a queste cause le frequenze geniche possono cambiare in seguito a selezione artificiale operata dall'uomo in cui gli accoppiamenti avvengono tra individui scelti in quanto ritenuti migliori per determinate caratteristiche e funzioni.

Sia la selezione naturale che quella artificiale provocano un aumento della frequenza degli alleli che migliorano i caratteri selezionati. Infatti all'azione operata dall'uomo si aggiunge

anche quella della selezione naturale, che continua ad agire in grado maggiore o minore a seconda delle condizioni ambientali.

Tuttavia la pressione selettiva esercitata dall'uomo e quella naturale non sempre agiscono nella stessa direzione, in quanto spesso l'uomo è alla ricerca di caratteri particolari (anomali) allontanandosi da quelle che sono le caratteristiche medie della specie (normali).

Bisogna però ricordare che in una popolazione consanguinea il numero di genotipi è limitato, pertanto il miglioramento conseguente alla selezione operata dall'uomo non può continuare indefinitamente.

Una popolazione può rispondere alla selezione fino a quando la sua media è diversa di molte deviazioni standard dalla media della popolazione originale, ma alla fine la popolazione raggiunge un limite di selezione oltre il quale non si ha miglioramento.

Nel caso estremo, non si ha più progresso genetico perché tutti gli alleli di quel carattere sono fissati o andati persi e pertanto l'ereditarietà di quel carattere è zero.

Bisogna tener presente che nell'ambito delle singole razze la presenza di una certa variabilità è senz'altro una ricchezza. Se non esiste variabilità, non esiste possibilità di evoluzione per la razza e di adattamento a nuove situazioni e così pure l'opera di selezione verrebbe a cadere.

Nonostante ciò ci deve essere una certa uniformità ed è compito delle associazioni di razza fissare i limiti.

La consanguineità aumenta la frequenza degli omozigoti e riduce quella degli eterozigoti, pertanto molte malattie e forme patologiche dovute a caratteri recessivi vengono a manifestarsi col il suo aumento. La consanguineità può essere usata bene o male a seconda delle competenze e capacità dell'allevatore.

E' necessario partire da riproduttori veramente selezionati e controllati su un sufficiente numero di discendenti al fine di conoscere meglio il loro genotipo. Solo allora il riproduttore potrà essere utilizzato con una certa sicurezza anche con accoppiamenti in consanguineità.

La consanguineità permette di rilevare, in un numero ridotto di generazioni, le qualità e i difetti dei riproduttori utilizzati. Bisogna però non farsi prendere la mano e, per anticipare i tempi, impiegare accoppiamenti troppo stretti, perché così facendo facilmente si otterranno risultati negativi.

L'allevatore deve sforzarsi di essere obiettivo, non lasciandosi trascinare dai sentimentalismi e analizzare i propri prodotti con la massima scrupolosità.

La consanguineità senza una selezione rigorosa è un grave errore che può portare anche a considerevoli deterioramenti della qualità del proprio allevamento.

Gli allevatori preparati temono la consanguineità specie quando l'allevamento ha un numero limitato di soggetti, poiché si sa già in partenza che in breve tempo si arriverà a una situazione senza via di uscita, infatti da una parte l'allevatore sarà tentato a continuare con il suo ceppo e dall'altra sa che può andare incontro a depressione da inbreeding (conseguenza dell'eccessiva omozigosi).

D'altra parte l'impiego di nuovi riproduttori comporta l'introduzione di nuovi geni che potrebbero anche essere legati a caratteri indesiderati vanificando anni di lavoro e di selezione.

E' pertanto importante conoscere fino a che limite di consanguineità si possa arrivare e con rapidità questa possa aumentare impiegando differenti accoppiamenti tra parenti.

1.2 STRUMENTI DI CARATTERIZZAZIONE GENETICA: I MARCATORI

1.2.1 Marcatori genetici

I marcatori genetici sono locus genici che identificano univocamente una regione cromosomica.

Si possono suddividere in:

- marcatori Morfologici: i primi strumenti di discriminazione degli individui all'interno di una popolazione, come ad esempio i marcatori mendeliani del colore e forma delle cariossidi o dei fiori; questi marcatori sono identificati fenotipicamente non sono molto numerosi e il loro numero in natura dipende dalla specie di riferimento .

- marcatori biochimici:
 1. gruppi sanguigni (identifichiamo gli individui attraverso analisi sanguigne, in passato usato di frequente anche negli esseri umani in pratiche forensi prima dell'avvento dell'analisi del Dna);
 2. isoenzimi (forme alternative dello stesso enzima, catalizzano la stessa reazione ma presentano diversa struttura biochimica e sono pertanto separabili elettroforeticamente);

- marcatori molecolari: segmenti di DNA che possono essere rilevati, per es. attraverso un gel di agarosio, sono utilizzati per identificare un locus genico, un gruppo di linkage o un evento di ricombinazione. Il locus genico è rilevabile con sonde o “probe” o inneschi “primers” specifici che discriminano in modo inequivocabile il tratto cromosomico e le regioni adiacenti (estremità 5’ e 3’). Questi marcatori rilevano la variabilità dovuta a mutazioni di regioni di DNA omologhe in individui diversi appartenenti alla stessa specie o a specie diverse (ad es. SNP, microsatelliti, RFLP, AFLP, RAPD etc.);

1.2.2 Marcatori morfologici

Questi marcatori sono semplici da individuare in quanto la loro rilevazione si basa sull’analisi del fenotipo dell’individuo.

Sono purtroppo scarsi in natura ma nella maggior parte dei casi facili da osservare , per es. il colore del pelo, la presenza di corna, etc..

Anche Linneo (1707- 1778) e ancor prima Teofrasto (371 a.C. - 287 a.C), Plinio il vecchio (23 d.C.-79 d.C.) e molti altri botanici classificarono la flora sulla base della variazione dei fenotipi che nella semplicità dell’epoca potevano osservare, creando legami tra individui simili e associando questi ultimi a un genere, specie, ordine, famiglia etc., questa classificazione antica nel caso di Linneo è ancora vigente.

I marcatori morfologici hanno però diversi limiti quali:

- **epistasi:** fenomeno per cui lo stato allelico di un gene X è incomprensibile, osservando solo il fenotipo legato ad esso, a causa della presenza (epistasi dominante) o dell'assenza (epistasi recessiva) di un secondo gene non allelico Y che impedisce (nell'epistasi dominante) o coadiuva (nell'epistasi recessiva) la medesima conversione da un fenotipo a un altro;
- **pleiotropia:** un unico allele in grado di influenzare aspetti multipli del fenotipo di un essere vivente;
- **dominanza incompleta:** fenotipo intermedio tra quelli dei due omozigoti (dominante e recessivo);
- **influenza dell’ambiente:** l’ambiente può influenzare positivamente o negativamente lo sviluppo dell’organismo, se quest’ultimo sarà sottoposto ad un ambiente ostile mostrerà, per esempio, una crescita stentata anomala se paragonata alla normale crescita in condizioni favorevoli;

- **fenotipo non sempre riconducibile subito ad un determinato genotipo;**
- **base genetica di controllo spesso sconosciuta;**
- **numero limitato e scarso polimorfismo;**
- **caratteri di tipo quantitativo;**

1.2.3 Marcatori molecolari

Attualmente l'analisi della variabilità genetica di una popolazione per impostare opportune strategie di conservazione, viene effettuata mediante l'uso di tecniche biomolecolari, capaci di rilevare la diversità (mutazioni) di regioni di DNA omologhe in individui diversi. Queste tecniche si basano sull'identificazione di specifiche regioni di DNA (loci genomici) che in virtù della loro presenza caratterizzano in modo univoco una determinata regione del DNA e quindi l'individuo a cui appartiene.

Come già descritto in precedenza le analisi per caratterizzare una popolazione di organismi, in passato, era svolta attraverso metodi visivi o legati alla biochimica dei singoli individui, col tempo però queste procedure sono state superate da altre basate sull'analisi del DNA e sulle differenze dello stesso nei singoli organismi di una popolazione al fine di studiarne la composizione genetica, la linea parentale o più globalmente la linea evolutiva tra specie diverse.

Gli impieghi principali dei marcatori molecolari sono:

- analisi di parentela;
- analisi di anomalie genetiche;
- analisi forensi;
- identificazione di QTL o geni utili;
- miglioramento delle specie vegetali e animali;
- studio della struttura, evoluzione e biodiversità delle popolazioni;
- studio di epidemiologia;
- tracciabilità dei prodotti animali e dei OGM;
- conservazione della natura;
- studi di filogenesi e evoluzione;
- stima della consanguineità e ausilio ai piani di accoppiamento;

Un marcatore molecolare è definito come quel locus genico, rilevabile con sonde e primer specifici che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico e inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica e rileva eventuali differenze

alleliche presenti nel tratto di DNA in analisi evidenziando polimorfismi nella sequenza nucleotidica dovuti ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi ecc.

I marcatori molecolari sono neutrali. consentono un'indagine dettagliata, analizzando, oltre ai tratti di DNA codificante anche le sequenze di DNA non codificante.

Il loro principale vantaggio è dato dall'ampio grado di informazioni ottenute dalle differenze geniche degli individui di una popolazione, oltre che dalla riproducibilità dei risultati.

Gli unici limiti sono quasi sempre di natura economica o esecutoria, in quanto i costi delle analisi, specie le più fine, sono molto elevati e la loro facilità, in alcuni casi, resta ancor oggi poco accessibile.

Il grado di polimorfismo del singolo marcatore è direttamente proporzionale al suo potere di discriminazione e di conseguenza più aumenta il numero di polimorfismi più aumenteranno le informazioni sulla popolazione in esame.

A seconda dell'utilizzo o dello scopo, maggiore è il numero di marcatori e migliore è il risultato statistico.

I caratteri principali dei marcatori molecolari sono:

- sono applicabili universalmente;
- identificano polimorfismi a livello di DNA;
- offrono la possibilità di coprire tutto il genoma permettendo di rilevare differenze anche tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili;
- presenti in campioni di qualsiasi tessuto (ubiquitari);
- stabili;
- numerosi e facili da monitorare (semplicità base genetica di controllo);
- non influenzati dall'ambiente, dall'età o dal sesso dell'individuo;
- analisi automatizzabili;
- presentano eredità Mendeliana;
- non risentono, al contrario dei morfologici, di effetti pleiotropici o epistatici;
- possono essere codominanti ovvero permettono di distinguere un eterozigote da un omozigote;

per le specie animali più studiate (bovini, ovini, caprini) sono disponibili centinaia di loci microsatelliti già "mappati", data la possibilità di trasferimento inter-specie e la conservazione

delle sequenze fiancheggianti è possibile utilizzare gli stessi per altre specie meno caratterizzate es. gli ungulati selvatici. Più recentemente per le specie di maggiore interesse zootecnico sono stati resi disponibili panel di diverse decine di migliaia di SNP.

I limiti principali:

- difficoltà analisi;
- costo in alcuni casi ancora elevato;
- tempi a volte troppo lunghi;
- necessità di conoscenze preliminari (sequenze);

Tra i marcatori molecolari più studiati ed utilizzati nei vari campi della ricerca vi sono: RAPD, PCR-RFLP, AFLP, SNP e Microsatelliti.

Il marcatore genetico “ideale” deve essere stabile, non influenzato dall’ambiente, facile da monitorare, numeroso e presente in qualsiasi tessuto, indipendente dal sesso e dall’età dell’animale, polimorfico, codominante e neutrale, inoltre l’analisi svolta deve risultare automatizzabile ed economica.

1.2.4 Tipologie di marcatori molecolari

a) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Si basa sulla tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction) e quindi sull'amplificazione di frammenti del DNA. In questa metodica vengono impiegati, dei primer di sole 10 basi azotate che portano, solitamente, all'amplificazione di un numero di frammenti del DNA variabile da 5 a 10.

I RAPD sono stati ampiamente applicati per il fingerprinting e ciò è dovuto al fatto che gli stessi presentano numerosi vantaggi rispetto alle altre metodologie: hanno elevato potere discriminante, rapidità operativa, non necessitano di alte quantità di DNA, costi abbastanza bassi e facilità di automazione.

Quest’analisi ha come limite principale la bassa riproducibilità, inoltre essendo marcatori dominanti non sono in grado di distinguere gli omozigoti dagli eterozigoti fornendo di fatto un più basso livello di informazione.

b) PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Questa analisi consiste nella valutazione delle differenze in peso molecolare dei frammenti ottenuti dall'amplificazione (PCR) e dalla successiva digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione.

Il polimorfismo evidenziato è dovuto a cambiamenti nelle sequenze di DNA nel sito di restrizione, a variazioni nella lunghezza dei frammenti di restrizione (per inserzioni o delezioni) oppure a riarrangiamenti nucleotidici nella regione di ibridazione della sonda.

Le analisi PCR-RFLP rilevano la variabilità di sequenze presenti a copia singola o poco ripetute, e la codominanza li rende appropriati per la costruzione di mappe geniche e per la caratterizzazione genetica.

Lo svantaggio principale è la necessità di conoscenze preliminari delle sequenze dei primer e dei siti di restrizione.

c) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

La tecnica AFLP si basa sull'amplificazione selettiva mediante PCR di frammenti di DNA derivanti da digestione con specifici enzimi di restrizione.

L'origine dei polimorfismi AFLP è molteplice: riarrangiamenti del DNA che determinano la perdita o la creazione di siti di restrizione, cambiamenti nella sequenza riconosciuta dalle basi selettive di uno o entrambi i primer oppure variazioni della lunghezza totale del frammento ristretto amplificato. Questi marcatori, sono inoltre in grado di analizzare anche le regioni localizzate nei telomeri, regioni dove i marcatori RFLP sono poco efficienti.

Gli AFLP consentono di studiare la diversità genetica delle specie sotto il profilo dell'evoluzione del genoma, della variabilità, della filogenesi e della distribuzione geografica. Sebbene questi marcatori, come gli RFLP, siano dominanti, in alcune loro applicazioni è possibile effettuare uno "scoring" quantitativo codominante dei prodotti di amplificazione.

L'importante vantaggio dei marcatori AFLP è che non necessitano di una conoscenza preliminare delle sequenze genomiche per il disegno di primer.

d) SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Questa classe di marcatori molecolari consente di rilevare il polimorfismo riconducibile a differenze di singoli nucleotidi. Questa analisi richiede primer nucleotidici che fiancheggiino una particolare regione cromosomica, laddove esistano polimorfismi dovuti a singoli nucleotidi.

L'individuazione delle regioni migliori dove disegnare i primer necessita che le sequenze nucleotidiche corrispondenti ad uno stesso gene vengano preventivamente selezionate da un numero rilevante di individui diversi e confrontate tra loro.

A differenza di tutti gli altri marcatori PCR-derivati, il polimorfismo SNP non è visualizzato mediante separazione elettroforetica dei prodotti di amplificazione bensì mediante il loro sequenziamento diretto e il successivo allineamento delle sequenze ottenute in modo da mettere in evidenza le differenze dovute a mutazioni puntiformi (sostituzioni) oppure a delezioni o inserzioni.

La variabilità data dai singoli nucleotidi è pertanto facile da determinare e consente anche di ricostruire in modo rapido i possibili aplotipi (insieme di alleli marcatori a loci strettamente associati ereditati in blocco e che consentono di discriminare un singolo genotipo in maniera inequivocabile) presenti in una popolazione.

e) Microsatelliti o SSR (Simple Sequences Repeat)

Con questo termine vengono indicate le regioni di DNA caratterizzate da una ripetizione in tandem di una stessa sequenza di 2-6 basi azotate, per es. (AG)_n. La ripetizione AT è la più frequente nelle piante, mentre nei mammiferi è più frequente la ripetizione (AC)_n.

Le ripetizioni dinucleotidiche sono molto comuni e sono altamente polimorfiche (Russel P.J.,2002).

I marcatori possono essere suddivisi in perfetti, quando sono costituiti da una sequenza ininterrotta di ripetizioni dello stesso motivo di base, imperfetti, quando la sequenza ripetuta risulta interrotta da una o più sequenze non ripetute, e composti, quando sono costituiti da una sequenza di ripetizioni perfetta o imperfetta adiacente ad una seconda sequenza di ripetizioni con diverso motivo di base.

Il numero di ripetizioni del motivo di base del microsatellite è molto variabile, causando polimorfismo, mentre le regioni fiancheggianti dove sono disegnati i primer che permettono il rilevamento di tali ripetizioni, sono conservate.

Attualmente, sono reperibili centinaia di marcatori microsatellite già mappati per le specie animali più studiate (bovini, ovini, ecc.).

Sono molto diffusi e interspersi nel genoma, inoltre presentano un elevato livello di variabilità all'interno di ciascuna specie, il che li rende un ottimo strumento per il fingerprinting, la caratterizzazione genetica, le analisi forensi e di parentela nonché per il miglioramento genetico. I vantaggi dei microsatelliti risiedono nella loro elevata riproducibilità e nel loro elevato grado di polimorfismo.

È stato stimato che esiste, in media, una regione SSR ogni 50-750 Kb, in funzione del tipo di motivo ripetuto. Attraverso l'utilizzo di primer specifici è possibile amplificare queste zone del genoma e renderle quindi rilevabili mediante tecniche elettroforetiche.

I primer consentono di amplificare singoli microsatelliti che possono differire tra individui non per il motivo di base, ma per il numero di volte che questo motivo è ripetuto.

Gli SSR sono una classe di marcatori molecolari capaci di mettere in evidenza all'interno delle popolazioni analizzate una diversità genetica difficilmente rilevabile con altri tipi di marcatori, poiché i polimorfismi sono localizzati in regioni ipervariabili e non espresse del genoma.

1.3 MICROSATELLITI

1.3.1 Slippage dei microsatelliti

A volte può accadere che l'enzima DNA polimerasi commetta degli errori durante la reazione di allungamento, dimenticando di incorporare dei nucleotidi nella sequenza, originando così, oltre al prodotto di amplificazione atteso, anche altri di minor dimensione.

Questo fenomeno prende il nome di slippage della DNA polimerasi.

Lo slittamento della replicazione avviene anche durante l'amplificazione mediante la PCR di sequenze microsatellite in vitro. Una caratteristica di tali amplificazioni è la presenza di bande stutter (prodotti minori) che differiscono in peso e dimensioni dai prodotti principali amplificati.

1.3.2 Mutazioni

Le mutazioni occasionali della lunghezza del DNA del tratto microsatellite sono attribuibili allo scivolamento dei 2 filamenti di DNA durante la replicazione (slippage replicativo) e ad errori del sistema di riparazione delle basi del DNA.

Questo meccanismo è in grado di creare l'inserzione o la delezione di uno o più elementi del motivo ripetuto con tasso piuttosto alto (10^{-4} mutazioni per divisione cellulare).

Ciò crea, livelli alti di polimorfismi di lunghezza come dimostrano dati sulla diversità genetica nei loci microsatelliti degli animali, espressa in numero di alleli ed eterozigosi in una popolazione (De Woody, 2005). Questa caratteristica è uno dei vantaggi di questi marcatori codominanti in studi di genetica di popolazione.

Il fattore più importante per la mutazione è la lunghezza del microsatellite, è stato dimostrato che la frequenza di mutazione è direttamente proporzionale al numero di unità ripetute.

1.3.3 Vantaggi e limiti dei microsatelliti

Come già citato in precedenza i marcatori microsatellite sono marcatori codominanti, il che li rende un ottimo strumento per discriminare l'allele, nel caso di omozigosi, o gli alleli, nel caso di eterozigosi.

I vantaggi dei microsatelliti risiedono nella loro elevata riproducibilità e nel loro elevato grado di polimorfismo.

I marcatori SSR sono in grado di mettere in evidenza un'elevatissima diversità genetica ma presentano alcune limitazioni nello studio della struttura e della ripartizione della variabilità genetica entro e tra popolazioni.

1.4 I CONIGLI DA "PET"

1.4.1 Origine

Il coniglio nano, ha origine dal coniglio domestico e ha radici ancora più remote in quello selvatico.

L'allevamento del coniglio ha origine in Africa nel 3000 a.C.

Introdotta in Spagna e nel bacino del mediterraneo nel 1100 a.C. dalle navi fenicie, diviene subito animale da allevamento a scopi unicamente alimentari o vestiari.

La selezione vera e propria inizia però nel sedicesimo secolo ad opera di figure ecclesiastiche, che iniziarono a selezionare le diverse razze.

Negli ultimi tempi dalle razze dei conigli domestici, in seguito a vari incroci si è venuto a selezionare il coniglio nano, che ormai è diffuso come animale domestico da compagnia.

1.4.2 Descrizione

Il coniglio, *Oryctolagus cuniculus*, appartiene alla Famiglia dei Leporidi dell'Ordine dei Lagomorfi, come la lepre. I conigli sono originari dell'Europa centrale e meridionale e del Nord Africa; i conigli sono animali gregari; vivono in gruppi in tane che scavano nel terreno con le unghie. Generalmente durante il giorno restano nascosti nelle tane ed escono la sera per alimentarsi. Si muovono con una serie di salti che eseguono con le lunghe zampe posteriori. La struttura del corpo e la taglia variano considerevolmente secondo la razza. Si va dalle razze giganti come il gigante fiammingo che può arrivare a 8 kg, al nano olandese che pesa meno di un kg. Le razze riconosciute sono più di 60, e i mantelli e i tipi di pelo comprendono moltissime varietà. La durata della vita è di 5-10 anni, raramente può arrivare fino a 15.

1.4.3 Anatomia e abitudini

I conigli hanno una vista eccellente, con un campo visivo che permette di vedere in tutte le direzioni senza muovere la testa. Le orecchie, essendo molto vascolarizzate, hanno un ruolo importante nella termoregolazione; sono delicate e sensibili, e non devono assolutamente essere utilizzate per afferrare il coniglio.

I conigli sono coprofagi e mangiano direttamente dall'ano un tipo particolare di feci che costituisce un'importante fonte di proteine, vitamine e minerali. Lateralmente al pene o alla vulva sono presenti due tasche inguinali che contengono ghiandole odorifere utilizzate per marcare l'ambiente. Diversi giorni prima del parto la coniglia inizia a strapparsi il pelo dall'addome e dalla parte ventrale del torace per imbottire il nido. Tuttavia in alcuni conigli lo strapparsi il pelo può rappresentare un vizio di comportamento. I maschi adulti sono piuttosto aggressivi e marcano l'ambiente con l'urina.

1.4.4 Commercio degli animali "pet"

Negli ultimi anni si è osservato in Italia, così come negli altri paesi occidentali, un aumento costante degli animali "alternativi" utilizzati come pet: come le diverse varietà di mammiferi, uccelli, rettili, anfibi, pesci ed invertebrati.

Le ragioni che spingono all'acquisto di un animale da compagnia diverso da un cane od un gatto sono molteplici. Alcuni animali, che possiamo definire "interattivi", come certi piccoli mammiferi (coniglio, furetto, cane della prateria, ecc.), possono stabilire con il proprietario un forte legame affettivo e rappresentano da questo punto di vista dei pet altrettanto validi di cani e gatti.

Un'indagine inglese (Pet Food Manufacturer's Association 2010) ha rivelato che i conigli da PET sono il quarto animale per numerosità, in gran Bretagna, dopo i pesci, il cane e il gatto, con un milione di individui venduti.

1.4.5 Marcatori molecolari e futuro dei conigli da “pet”

L'uso dei marcatori molecolari applicati alle indagini su questo tipo di animali è ancora primitivo e la bibliografia, su questo argomento, è molto limitata. Si capisce, quindi, che i marcatori molecolari saranno indispensabili per gli allevatori che intendono iniziare una campagna di monitoraggio e miglioramento nei confronti di questi animali, il cui commercio, negli ultimi 10 anni, ha subito un'impennata.

I marcatori molecolari in futuro saranno, quindi, certamente in prima linea nella caratterizzazione genetica dei conigli “pet”, in quanto numerosi allevamenti vorranno creare un pedigree dei propri animali controllando gli incroci e le linee da utilizzare.

2. OBIETTIVI

Obiettivo di questa tesi è la caratterizzazione genetica molecolare di un gruppo di conigli nani da “pet” al fine di studiare la diversità genetica e la struttura della popolazione per confrontare quest’ultima con una popolazione commerciale di conigli da carne.

In particolare è stato sviluppato ed applicato un panel di 22 marcatori molecolari microsatellite ad una popolazione di 128 conigli nani da “pet” e 32 conigli commerciali da carne utilizzati come “reference”.

3. MATERIALE E METODI

3.1 Prelievo dei campioni di sangue e tessuto

Per questo studio sono stati raccolti 128 campioni di sangue di coniglio nano provenienti dalle strutture del Dipartimento di scienze animali (DSA).

E' stato prelevato circa 1 cc di sangue da padiglione auricolare e subito immesso in una provetta siglata contenete eparina (anticoagulante).

Una volta ottenuto il campione è stato stoccato a -20°C fino all'utilizzo.

La sperimentazione ha previsto l'uso di tessuto di 32 conigli da carne (commerciali) prelevati dal macello e opportunamente siglati e conservati. L'indagine su questi campioni è servita da "reference" o confronto per la caratterizzazione genetica dei conigli da PET.

L'estrazione, quindi, è stata svolta su 2 matrici e protocolli diversi.

3.2 Estrazione del DNA da sangue e tessuto

a) estrazione di DNA da sangue di coniglio nano o "pet"

In ogni eppendorf da 1,5 ml siglata sono stati aggiunti 900 μl di RBC (Red Blood Cells Lysis Solution,, 155 mM di ammonio cloruro, 10 mM di potassio bicarbonato e 1 mM di EDTA) e 300 μl di sangue intero scongelato, è stata invertita ogni provetta e lasciata riposare per 10 minuti a temperatura ambiente.

Una volta finita l'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti.

E' stato rimosso il surnatante tranne pochi μl e successivamente vortexato il pellet per 20" per risospendere le cellule.

Di seguito sono stati aggiunti 300 μl di Cell Lysis (50 mM Tris HCl pH 8, 20 mM di EDTA e 2% SDS) al pellet pipettando su e giù per facilitare la lisi cellulare (generalmente non è necessaria l'incubazione, tuttavia se la soluzione dovesse presentare grumi si incuba a 37°C fino alla loro scomparsa).

In ogni campione sono stati aggiunti 3 μl di Rna-si invertendo più volte, quindi sono stati incubati a 37°C per 45 minuti.

Dopo l'incubazione si aggiungono 100 μl di PPS (Protein Precipitation Solution, ammonio acetato 10 M), si vortexa per 20" e si centrifuga per 4 minuti a 14000 rpm.

Il surnatante contenente il DNA è stato trasferito in nuovi tubi siglati insieme a 300 µl di isopropanolo e 1 µl di glicogeno (20mg/µl) invertendo dolcemente per permettere la precipitazione del DNA.

L'acido nucleico è poi purificato con 2 lavaggi in 300 µl di etanolo al 70%, essiccato ed infine risospeso in 100 µl di acqua sterile.

b) estrazione di DNA da tessuto di coniglio da carne (commerciale)

Per l'estrazione del DNA da tessuto (carne macinata), 50 mg di campione sono stati prelevati, sminuzzati, setacciati per l'eliminazione del grasso e posti in eppendorf siglate da 1,5 ml, unitamente a 300 µl di Cell Lysis. I campioni sono stati omogeneizzati all'interno della provetta pestellandoli più volte ed in seguito sono stati aggiunti 1,5 µl di Proteinase K, enzima usato per la digestione di proteine all'interno della soluzione. Una volta invertito per circa 20 volte, le eppendorf sono state incubate in bagnetto termostato a 55°C per 3-4 ore (non overnight perché la carne è macinata e quindi facilmente aggredibile dall'enzima) per favorire l'azione litica.

Dopo l'incubazione sono stati aggiunti 1,5 µl di Rna-si (Amersham Biosciences, concentrazione finale 4 mg/ml) e le provette sono state incubate nuovamente per 1 ora a 37°C per digerire l'Rna presente nella soluzione.

Una volta terminata l'incubazione le proteine e i frammenti indesiderati all'interno della soluzione sono stati eliminati per precipitazione con 100 µl di PPS e successiva centrifugazione a 14000 rpm per 7 minuti; il surnatante contenente il DNA è stato trasferito in una nuova eppendorf siglata unitamente a 300 µl di isopropanolo e 1 µl di glicogeno.

Il DNA è poi purificato con 2 lavaggi in 300 µl di etanolo al 70%, essiccato ed infine risospeso in 100 µl di acqua sterile.

3.3 Amplificazione dei loci microsatelliti

I 160 individui sono stati genotipizzati ai seguenti loci microsatelliti: Inra0169, Inra0204, Inra0192, Inra0142, Inra0096, Inra0100, Inra0163, Inra0074, Inra0010, Inra0211, Inra0138, Inra0139, Inra0190, Inra0094, Inra0304, Inra0072, Inra0260, Inra0286, Inra0152, Inra0155, Inra0023 e D6utr4 (Korstanje et al., 2003; Chantry-Darmon et al., 2005).

Tutti i loci sono stati amplificati in singleplex; 40 ng di DNA sono stati aggiunti a 16 µl di mix di amplificazione (i dettagli sono riportati in tabella n.2). Le amplificazioni sono state

effettuate su un termociclatore GeneAmp 9700 (Applied Biosystem) con le seguenti condizioni di reazione: denaturazione a 94°C per 30", annealing per 30" alla temperatura riportata in tabella 1, extension a 72°C per 40" e 7 minuti di extension finale.

Il primer forward di ogni marcatore è stato marcato con uno tra i fluorofori D2 D3 e D4 per la visualizzazione tramite sequenziatore capillare (vedi tabella n.1).

La dimensione dei frammenti è stata determinata mediante sequenziatore capillare CEQ8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) utilizzando il software Genetic Analysis Software v.9.0. Tutti i marcatori sono stati analizzati in due pool utilizzando 0,5 µl di prodotto per ogni amplificato (precedentemente essiccato), 0,5µl di SizeStandard-400 e 39.5 µl di SLS.

3.4 Analisi Statistica

Le frequenze alleliche, il numero di alleli per locus, l'allelic richness (una stima del numero medio di alleli per locus corretta per le dimensioni del campione), l'eteroziosità osservata e attesa (Nei, 1987) sono state calcolate per locus e popolazione utilizzando il software MSA v.4.05 (Dieringer and Schlotter, 2003). Il test per la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (Guo e Thompson, 1992) è stato effettuato utilizzando una simulazione Markov Chain Monte Carlo (100 batches, 10000 iterazioni per batch e 10000 dememorizzazioni) come implementato nel software Genepop v.4.0 (Rousset, 2008). Coefficienti di inbreeding molecolare (f_{ij}) sono stati calcolati entro e tra gruppi come descritto da Caballero e Toro (2002) utilizzando il software Molkin v3.0 (Gutierrez et al., 2005).

Le distanze genetiche tra gli individui sono state stimate come descritto da Nei (1983) utilizzando il software MSA: le distanze genetiche individuali sono state visualizzate tramite un albero neighbor-joining (figura 3) utilizzando il software MEGA v.4 (Tamura et al., 2007).

La struttura della popolazione e il più probabile numero di cluster K nel dataset è stato calcolato utilizzando il software Structure v.2.3.3 (Pritchard et al., 2000). Le analisi sono state effettuate utilizzando un modello admixture con frequenze alleliche correlate: per ottenere un valore rappresentativo di K, sono state effettuate 50 corse indipendenti per ogni K compreso tra 1 e 10 con un burn-in di 50000 iterazioni seguito da 200000 iterazioni per la raccolta dei dati. Il più probabile numero di cluster (K) è evidenziato graficamente in figura 1 dove sono rappresentati i valori di $\ln Pr(G|K)$ per le 50 corse indipendenti di ogni K come suggerito da Pritchard et al. (2000).

I coefficienti di appartenenza individuale ad ogni cluster sono stati rappresentati tramite software Distruct (Rosemberg, 2004) per le corse con i maggiori valori di $\ln Pr(G|K)$.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Variabilità genetica e caratteristiche dei loci microsatellite

Il riepilogo delle statistiche di ogni marcatore compresi la localizzazione cromosomica, le dimensioni, il numero di alleli per marcatore, l'allelic richness, il PIC (Polymorphic information content) e la diversità genetica sono rappresentati in tabella.3. Il numero totale di alleli rilevato è 114 e tutti i marcatori si sono mostrati polimorfici in entrambi i gruppi. Il numero medio di alleli per locus è stato 5,18 con un minimo di 3 (Inra 138, Inra 190 e Inra 260) e massimo 9 (Inra 192).

L'allelic richness è stata 4,36 con una diversità genetica media pari a 0,557 con un minimo di 0,213 (Inra260) e un massimo di 0,767 (Inra 304).

4.2 Diversità genetica entro popolazione.

I valori di diversità genetica entro le due popolazioni sono riportati in tabella 4. L'eterozigosità osservata per i due gruppi è molto simile (0,471 per la popolazione PET e 0,443 per popolazione commerciale) mentre la più bassa diversità genetica è presente nella popolazione commerciale (0,461).

Nella popolazione commerciale l'eterozigosità attesa non differisce da quella osservata mentre quest'ultima è stata inferiore a quella attesa nella popolazione PET.

La popolazione commerciale presenta anche il minor numero di alleli per locus (3,4) e la minor allelic richness (3,4).

Una deviazione significativa ($P < 0.001$) dall'equilibrio H-W è stata osservata in entrambe le popolazioni e si riflette anche nel valore dell'indice F_{IS} che è abbastanza elevato nel gruppo PET mentre è solo leggermente positivo nel gruppo commerciale.

La diversità genetica entro gruppo può essere anche valutata utilizzando gli indici di inbreeding molecolare che sono una misura della parentela genetica tra gli individui, questa stima è risultata maggiore nella popolazione commerciale (0,548) che in quella PET (0,462).

La differenziazione genetica tra i due gruppi è risultata elevata, l'indice F_{ST} è pari a 0,137 ($P < 0,001$) inoltre il test per la differenziazione delle popolazioni ha dimostrato una differenza nella distribuzione delle frequenze alleliche tra gruppi altamente significativa ($P < 0,001$).

4.3 Struttura della popolazione

Il software Structure è stato utilizzato per definire la struttura delle popolazioni e il grado di admixture degli individui, il software implementa un algoritmo che è in grado di analizzare la "struttura nascosta" della popolazione senza utilizzare alcuna conoscenza a priori riguardo il numero di cluster (popolazioni) presenti nel dataset. Nella figura 1 sono rappresentati i valori di $\ln Pr(G|K)$ per ogni K e per ogni corsa.

Il valore di K più probabile è rappresentato dal valore massimo di $\ln Pr(G|K)$, nel grafico si può notare come i valori massimi di $\ln Pr(G|K)$ hanno raggiunto un plateau a partire da $K=5$ mentre il valore massimo assoluto di $\ln Pr(G|K)$ è stato raggiunto per $K=7$. Nonostante ciò i valori più consistenti tra le corse sono stati ottenuti per $K=4$, $K=5$, e $K=6$.

I risultati dell'analisi di Structure sono rappresentati in figura 2 per K che varia da 4 a 6. Indipendentemente dal numero di cluster, è stata possibile una chiara distinzione tra le due popolazioni: la popolazione commerciale si separa chiaramente dalla popolazione PET con un'elevata proporzione di appartenenza (0,929 considerando $K=5$) e senza la presenza di admixture.

Dall'altra parte la popolazione PET ha mostrato una struttura di popolazione maggiormente complessa con una proporzione di appartenenza divisa in 3 e più cluster e con la presenza di individui con origine mista. L'albero neighbor-joining basato sulle distanze di Nei (Nei et al., 1983) ha mostrato che gli individui clusterizzano separatamente in accordo con le loro origini (figura 3).

5. CONCLUSIONI

Questo lavoro ha avuto come scopo la caratterizzazione genetica di conigli nani per i quali non si conosceva la struttura genetica né sono state trovate rilevanti informazioni in letteratura (Queney et al., 2002).

L'implementazione di un panel di marcatori molecolari microsatelliti ha permesso l'analisi della diversità genetica della popolazione che si è dimostrata utile come strumento di monitoraggio e selezione per le diverse razze.

La popolazione PET ha mostrato una maggiore diversità genetica ($AR = 4,2$) rispetto alla popolazione commerciale ($AR = 3,4$); l'eterozigosità osservata nei due gruppi è risultata molto simile (0,471 e 0,443 rispettivamente per le popolazioni PET e commerciale) ma vicina a quella attesa (H_E) solo nella popolazione commerciale.

Il deficit di eterozigoti nella popolazione PET rispetto ai valori attesi è identificata anche dal valore elevato dell'indice F_{IS} (0,139). L'eccesso di omozigoti può essere principalmente imputato ad un incremento dell'inbreeding causato da incroci non casuali.

Si può quindi concludere che la popolazione PET in esame era composta da individui non omogenei suddivisi in tre o più sottogruppi in cui è presente un discreto livello di inbreeding mentre dall'altra parte gli individui facenti parte della popolazione commerciale risultano geneticamente molto omogenei, come ci si aspettava data la tipologia di produzione dell'ibrido commerciale secondo uno schema a "4 vie" per la produzione di individui estremamente performanti ed omogenei.

6. BIBLIOGRAFIA

- Barcaccia, G. e Falcinelli, M. (2006). Marcatori Molecolari RFLP e PCR- derivati. *Genetica e Gnomica* Vol. 3, 832-834.
- Caballero, A. and Toro, M. (2002). Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation genetics* 3, 289-299.
- Chantry-Darmon, C., Urien, C., Hayes, H., Bertaud, M., Chadi-Taourit, S., Chardon, P., Vaiman, D., and Rogel-Gaillard, C. (2005). Construction of a cytogenetically anchored microsatellite map in rabbit. *Mammalian Genome*, 16: 442-459.
- Dieringer, D. and Schlotterer, C. (2003). Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite datasets. *Molecular Ecology Notes* 3, 167-169.
- Guo, S. W. And Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.
- Gutierrez, J., Royo, L., Alvarez, I. and goyache, F. (2005). Molkin v2.0: A computer Program for Genetic Analysis of populations Using Molecular Coancestry Information. *J. Hered* 96, 718-721.
- Korstanje, R., Gillissen, G.F., Versteeg, S.A., Van oost, B.A., Bosma, A.A., Rogel-Gaillard, C., Van zutphen, L.F.M., and Van Lith, H.A. (2003). Mapping of rabbit microsatellite markers using chromosome-specific libraries. *Journal of Heredity*, 94(2):161-169.
- Nei, M., Tajima, F. and Tatenno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees for molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19, 153-170.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. And Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

- Queney, G., Vachot, A.M., Brun, J.M., Dennebouy, N., Mulsant, P., and Monnerot M. (2002). Different levels of Human intervention in domestic rabbits: effects on genetic diversity. *The Journal of Heredity*, 93(3):205-209.
- Rosenberg, N. A. (2004). Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4, 137-138.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8, 103-106.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Whitlock, R., Hipperson, H., Mannarelli, M., Butlin, R. K., Burke T. (2008). An objective, rapid and reproducible method for scoring AFLP peak-height data that minimizes genotyping error. *Molecular Ecology Resources*, Vol. 8, No. 4. (2008), pp. 725-735.

TABELLE

| Locus | Range (bp) | T° Annealing | Sequenza PRIMER | Default Dye Color | Pool |
|----------|------------|-----------------|---|----------------------|------|
| Inra0169 | 97 - 119 | 67 | Fw TGCTACCGTCCCTCCAATACC Rw AAATCCAGCTCATCAGCCTGC | D2 | A |
| Inra0204 | 127 - 139 | 69 | Fw TAGAGCGTGTGTGCAGATGTGG Rw CACACAGTTCGAGAATCAAAACCG | D2 | A |
| Inra0192 | 234 - 264 | 69 | Fw CTTAGATGCCGCAGTGCTGG Rw ATCTACCCACACTGTAAAGCCCC | D2 | A |
| Inra0142 | 184 - 196 | 69 | Fw CCCAGCAAGGTCCTCTTAAAACC Rw TTGGTGAGTGAAGTGCAGCTGG | D2 | A |
| Inra0096 | 143 - 151 | 69 | Fw TGAATTTGACCCAGAAAAGTACTCC Rw GCACTGTAAAGGGGAAACACTTGG | D3 | A |
| Inra0100 | 86 - 102 | 69 | Fw TTTTGGGGGTAAACTAAGTATGG Rw TGAAAGCAGAATGGCAGAGAGG | D3 | A |
| Inra0163 | 114 - 126 | 69 | Fw AAAGGAGGTGCTCCAGACAGC Rw CCCAAGTCTTCTAGACATTCGC | D3 | A |
| Inra0074 | 212 - 228 | 69 | Fw GGCATTTAGGGAGTGAACCAGC Rw TGGCAAGAAGGAGACTGCACG | D3 | A |
| Inra0010 | 182 - 198 | 69 | Fw TTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGC Rw GGCTGAAAGTCATTGCATGAAGC | D3 | A |
| Inra0211 | 82 - 96 | 69 | Fw CCTGCCACTTCTTTCAAAGG Rw TGTGGGGTGTCTTATTCAACC | D4 | A |
| D6utr4 | 145 - 153 | 69 | Fw GATCAGTGGATTACAGAAGGGC Rw AGCAAAAGAAGGCTCACACTTAGC | D4 | A |
| Inra0138 | 171 - 183 | 69 | Fw TGCAGGTTACACAGCTCTATAAGCC Rw TCTTTACCCACTACGCTGCAGC | D4 | A |
| Inra0139 | 108 - 116 | 69 | Fw CTCTAAGGGACTGTCTCTCTGCC Rw CGTGCACTTCCATGTGTGTGG | D4 | A |
| Inra0190 | 207 - 211 | 69 | Fw AATGGAATGGTTACTGCCAATACC Rw TTCTGGGAGAGCTAAGAAAAGTCG | D4 | A |
| Inra0094 | 220 - 234 | 67 | Fw GCTACCAGGATAATCTAAGGAGGGC Rw ATCTGCTACGCCACCATGCC | D4 | A |
| Inra0304 | 343 - 367 | 69 | Fw AAATGGTGCCTCGTGCATCTCTGG Rw GCCTGCAGCAAGAAACGACG | D4 | A |
| Inra0072 | 216 - 224 | 67 | Fw GAACCAACGGCAAAGGAAGACC Rw CTGCAGTGCCAGCCAATAGG | D3 | B |
| Inra0260 | 96 - 110 | 69 | Fw TGAAAGTCAGAGCCACACAGGG Rw CCATTTTGGCCAGTTGGGG | D3 | B |
| Inra0286 | 253 - 267 | 67 | Fw TTGCTCTGGAGGTGGAGGTTGTGG Rw TCTTGCTTAGAGGAGCCTCAGGCC | D4 | B |
| Inra0152 | 164 - 174 | 69 | Fw ATCCCTATTCCAGGCTCTTGCC Rw TTCCTGCCCACTCTGTTC | D3 | B |
| Inra0155 | 114 - 122 | 69 | Fw GCACACATGTACCTGAGTGTGG Rw TGAGACTTTTCTCCACTGACCACC | D2 | B |
| Inra0023 | 163 - 179 | 69 | Fw CACAGGAAGCTGGAATCTGTAAAGG Rw TTTGGGGAGTGAACCAGCG | D4 | B |

Tabella 1. Elenco dei primer utilizzate e le loro caratteristiche (Fw=forward, Rw=reverse)

| Reagenti | Quantità (µl) |
|---------------|---------------|
| Dna (10ng) | 4 |
| H2O (to 20µl) | 10 |
| Buffer (10X) | 2 |
| MgCl (50mM) | 1,6 |
| Dntps (5mM) | 0,8 |
| P1 (10%) | 0.5-0,7 |
| P2 (10%) | 0.5-0,7 |
| Taq Jena | 0,2 |
| Vol finale | 20 µl |

Tabella 2. Elenco e quantità dei reagenti della miscela di amplificazione.

| Locus | Frgment size | TNA | AR | PIC | GD |
|----------|--------------|------|------|-------|-------|
| Inra0010 | 182 - 198 | 4 | 3,2 | 0,451 | 0,534 |
| Inra0023 | 163 - 179 | 4 | 3,7 | 0,472 | 0,559 |
| Inra0072 | 216 - 224 | 4 | 3,2 | 0,437 | 0,545 |
| Inra0074 | 212 - 228 | 5 | 3,6 | 0,398 | 0,443 |
| Inra0094 | 220 - 234 | 6 | 4,4 | 0,466 | 0,539 |
| Inra0096 | 143 - 151 | 4 | 3,9 | 0,330 | 0,352 |
| Inra0100 | 86 - 102 | 7 | 5,4 | 0,534 | 0,588 |
| Inra0138 | 171 - 183 | 3 | 3,0 | 0,388 | 0,431 |
| Inra0139 | 108 - 116 | 5 | 4,7 | 0,628 | 0,692 |
| Inra0142 | 184 - 196 | 5 | 4,0 | 0,496 | 0,570 |
| Inra0152 | 164 - 174 | 6 | 5,7 | 0,685 | 0,731 |
| Inra0155 | 114 - 122 | 3 | 3,0 | 0,488 | 0,549 |
| Inra0163 | 114 - 126 | 6 | 5,7 | 0,685 | 0,731 |
| Inra0169 | 97 - 119 | 7 | 6,2 | 0,714 | 0,755 |
| Inra0190 | 207 - 211 | 3 | 2,8 | 0,200 | 0,218 |
| Inra0192 | 234 - 264 | 8 | 5,1 | 0,605 | 0,650 |
| Inra0204 | 127 - 139 | 6 | 5,3 | 0,520 | 0,568 |
| Inra0211 | 82 - 96 | 7 | 6,8 | 0,730 | 0,766 |
| Inra0260 | 96 - 110 | 3 | 2,5 | 0,193 | 0,213 |
| Inra0286 | 253 - 267 | 6 | 4,5 | 0,551 | 0,615 |
| Inra0304 | 343 - 367 | 7 | 5,7 | 0,728 | 0,767 |
| D6utr4 | 145 - 153 | 5 | 4,1 | 0,438 | 0,481 |
| Mean | | 5,18 | 4,36 | 0,504 | 0,557 |

Tabella 3: riepilogo statistico dei 22 loci microsatelliti analizzati in due popolazioni di conigli (160 animali); Locus, numero totale di allele individuati (TNA), ricchezza allelica (AR), informazioni sul contenuto polimorfico (PIC) e diversità genica (GD).

| Popolazione | Individui | MNA | AR | H_E | H_O | F_{IS} (95% CI) | f_{ij} |
|-------------|-----------|-----|-----|-------------------|-------------------|------------------------|------------------|
| Pet | 128 | 5 | 4,2 | $0,547 \pm 0,159$ | $0,471 \pm 0,236$ | 0,139 (0,106 - 0,163) | $0,462 \pm 0,04$ |
| Comm | 32 | 3,4 | 3,4 | $0,461 \pm 0,210$ | $0,443 \pm 0,237$ | 0,039 (-0,033 - 0,078) | $0,548 \pm 0,03$ |

Tabella 4: La diversità genetica all'interno dei due gruppi (160 conigli) basata su 22 marcatori molecolari microsatelliti, il numero di individui analizzati, il numero medio di alleli (MNA), la ricchezza allelica (AR), eterozigosità attesa (H_E) e osservata (H_O), indice F_{IS} e l'indice f_{ij} .

FIGURE

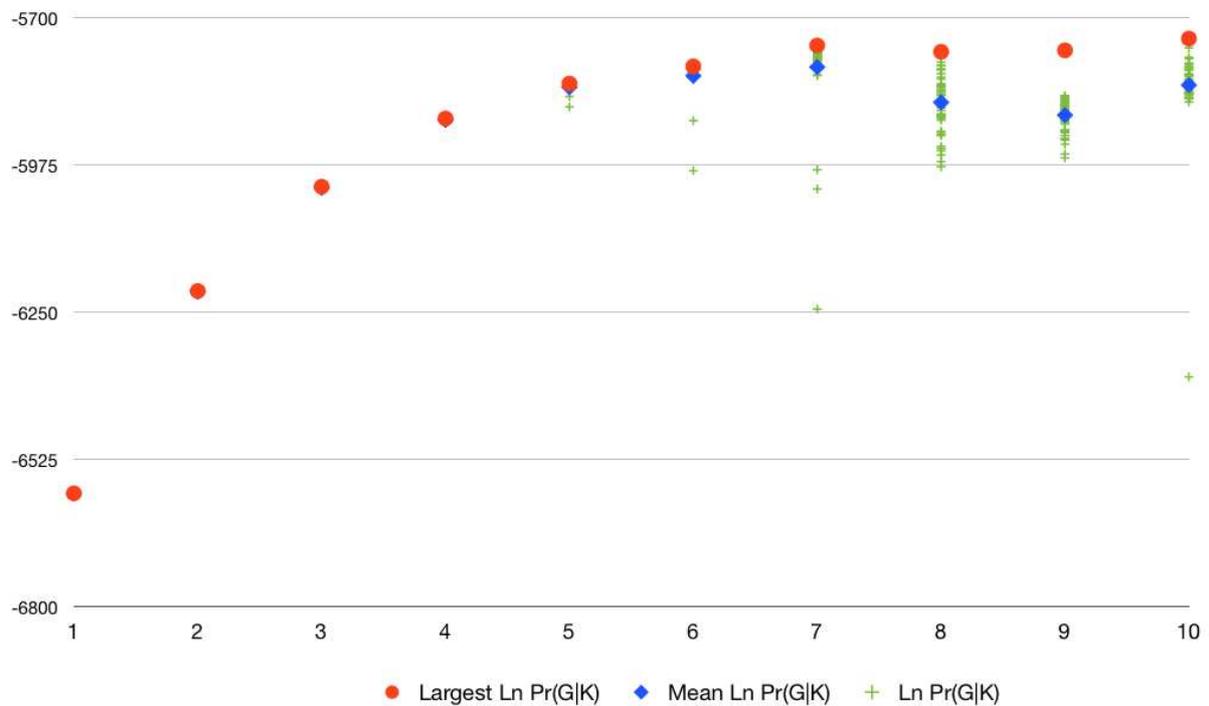


Figura 1: i valori $\ln Pr(G/K)$ presentati come una funzione del numero di cluster (Pritchard et al., 2000). I valori di $\ln Pr(G/K)$ all'interno di ogni K, per tutte le 50 corse, sono presentati con croci verdi, il più grande valore e la media di $\ln Pr(G/K)$ all'interno di ogni K (tra le 50 corse) sono rappresentati rispettivamente con cerchi rossi e diamanti blu.

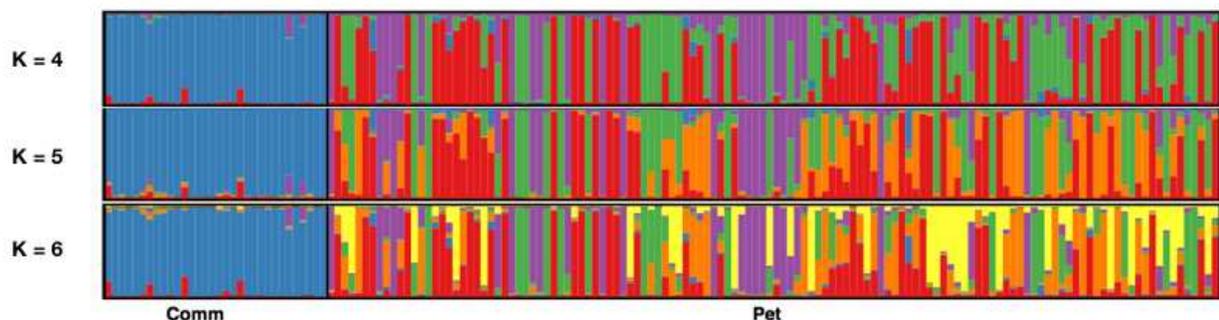


Figura 2: presentazione grafica di analisi di struttura della popolazione per un totale di 160 individui (definito in due sottopopolazioni). Ogni coniglio è rappresentato da una singola linea verticale suddivisa in segmenti di colore, con lunghezze proporzionale alla composizione stimata del tipo di cluster dedotto. Sono mostrate solo le rappresentazioni grafiche, per corse, eseguite con il valore di \ln e $Pr(G/K)$ più alto.

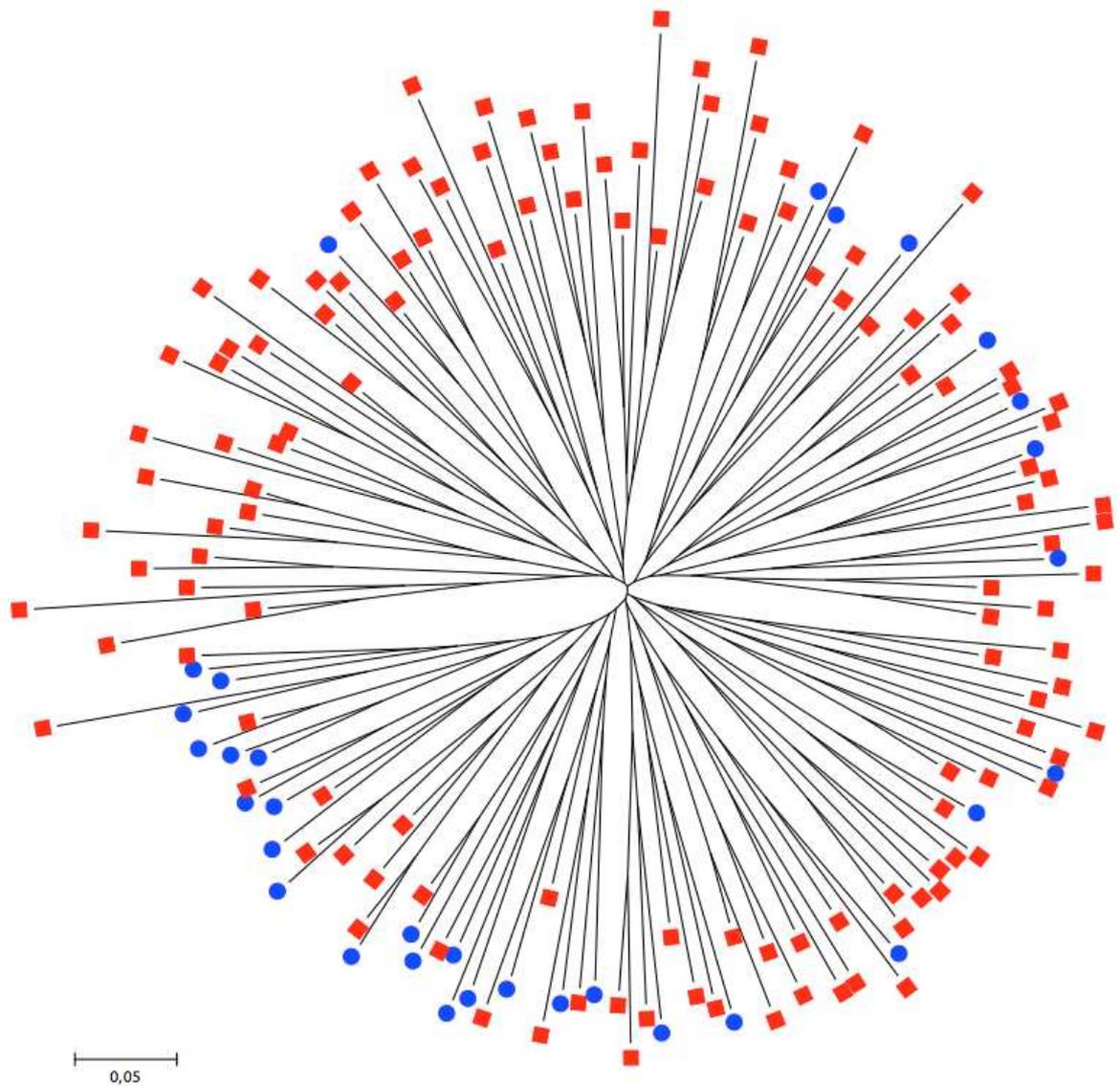


Figure 3: albero Neighbor-joining basato sulle distanze di Nei di conigli pet (quadrati rossi) e commerciali (cerchi blu).

Ringraziamenti

Un caloroso grazie ai miei genitori che mi hanno finanziato gli studi e che hanno subito le mie ansie da esame, un grazie a mia sorella che mi ha spesso aiutato, un grazie a tutti i miei compagni di corso (in particolare la Cate, Emanuele, Marco, Carlotta, Alessia e Giulio), che mi hanno spinto avanti anche quando la voglia mancava, che molto spesso mi hanno aiutato e con cui ho passato 3 bei anni tra alti e bassi compreso i sanitari che tanto saluto, anche se a volte non siamo andati molto d'accordo.

Un grazie a mia nonna Maria che, come i miei genitori, ha sperato che ultimassi in bellezza questi 3 anni e che ci teneva tantissimo che fossi il suo primo nipote a laurearsi anche quando molte volte rispondevo: “non ce la faccio più, basta”.

Ma in particolare un sentito ringraziamento va a Fabio Maretto che ha portato pazienza per 9 mesi fino alla laurea, come una gravidanza, e che spero in futuro voglia portare avanti questo progetto con me, lo ringrazio, anche perché sa usare bene il computer (lui sa a cosa mi riferisco).

Un altro grazie va alla Professoressa Antonella Dalle zotte e ad Alberto Sartori che ci hanno passato tutto il materiale sugli animali e che ci hanno presentato questo progetto, ammiro in particolare la reperibilità di Alberto che quando avevamo bisogno era sempre presente.

Un ultimo ringraziamento ma di certo il primo per importanza va a Roberto Mantovani, mio relatore della tesi, che ha portato, con me, forse più pazienza di quanta ne abbia avuta Fabio, sottolineo la sua simpatia e la sua professionalità.

Un grazie a tutti coloro che ho dimenticato con la fretta di scrivere queste poche righe.