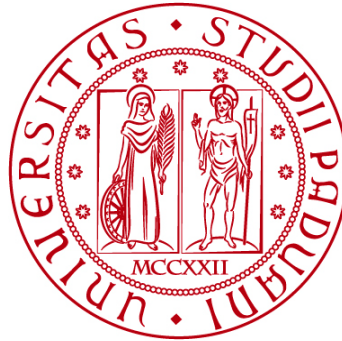


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**UTILIZZO DI DNA MICROSATELLITE
IN ANALISI GENETICHE DI PATERNITÀ
NELLA CASTAGNOLA
(*Chromis chromis* Linnaeus, 1758)**

**Tutor: Prof. Leonardo Congiu
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Linda Zanella

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

1. Introduzione	5
1.1. Analisi genetiche di paternità e parentela.....	5
1.2. Storia dei metodi: dal DNA fingerprinting ai microsatelliti	5
1.3. Microsatelliti: definizione e applicazioni	6
1.4. Analisi di paternità in <i>Chromis chromis</i>	8
1.4.1. <i>Chromis chromis</i>	8
1.4.2. Presentazione del problema biologico	8
2. Materiali e metodi	10
2.1. Preparazione dei campioni	10
2.2. Scoring dei campioni.....	10
2.3. Raccolta dei risultati	12
2.4. Controllo e correzione	13
3. Discussione dei risultati	14
3.1. Analisi ed interpretazione	14
3.2. Problemi riscontrati	15
3.3. Considerazioni finali	16
Bibliografia	17
Sitografia.....	18

1. Introduzione

1.1. Analisi genetiche di paternità e parentela

I progressi avvenuti nei campi della biologia molecolare e della genetica nel corso dell'ultimo secolo hanno consentito lo sviluppo di tecniche che permettessero di stabilire le relazioni biologiche tra gli individui.

Nella valutazione di queste tecniche emergono le analisi genetiche applicate alla determinazione di paternità e parentela. Esse sono basate sull'analisi e sul confronto di sequenze del genoma, le quali, presentando elevata variabilità genetica, permettono di indagare efficacemente i rapporti tra gli individui nel contesto biologico.

Tali analisi presentano numerose applicazioni pratiche. In ambito forense, possono supportare le indagini. In ambito medico, possono contribuire nella diagnosi di malattie genetiche ereditarie. In aggiunta, risultano fondamentali nel contesto biologico, poiché si rivelano essenziali per la comprensione delle dinamiche evolutive e comportamentali di popolazioni, e nel contesto ecologico, ai fini della conservazione delle stesse. Sono, infatti, molti gli studi in cui l'impiego di test per definire il livello di *relatedness* (parentela) ha permesso di trarre conclusioni significative.

A partire dalle prime teorie mendeliane, passando poi all'avvento di tecniche di genotipizzazione e amplificazione del DNA, fino a giungere alle moderne tecnologie per il sequenziamento, ogni avanzamento ha contribuito a rendere questo tipo di analisi sempre più accurato e accessibile.

1.2. Storia dei metodi: dal DNA fingerprinting ai microsatelliti

Inizialmente gli studi di parentela all'interno delle popolazioni si basavano prima sull'utilizzo di polimorfismi cromosomici e poi sulla tecnica dell'elettroforesi degli allosomi. In seguito negli anni Ottanta grazie all'avvento del *DNA fingerprinting* (impronta genetica) si è riscontrato un incremento dell'utilizzo delle analisi di parentela in numerosi campi, tra cui evoluzione ed ecologia del comportamento (Jones & Ardren, 2003).

DNA fingerprinting è una tecnica sviluppata dal genetista A. Jeffreys, la quale si basa sull'analisi e il confronto di porzioni ripetute del genoma costituite da unità di 10-60 paia di basi. Queste ripetizioni presenti nel DNA possono essere definite anche minisatelliti oppure ripetizioni in tandem a numero variabile (*Variable Number Tandem Repeats* VNRT), hanno lunghezza variabile e costituiscono un'impronta genomica unica. Infatti, questa tecnica è stata inizialmente progettata come strumento di identificazione all'interno delle indagini forensi. Successivamente essa ha trovato ancora applicazione negli studi di determinazione di paternità e parentela tra individui (Chambers *et al.*, 2014).

Conseguentemente alla diffusione della tecnica, si sono riscontrate alcune limitazioni della stessa. In primo luogo, sono necessarie grandi quantità di genoma affinché l'enzima di restrizione agisca correttamente. In secondo luogo, la tecnica del Southern blot risulta laboriosa e dispendiosa in termini di tempo affinché possa essere applicata frequentemente in laboratorio (Chambers *et al.*, 2014).

Successivamente la scoperta dei vantaggi dell'utilizzo di DNA microsatellite in qualità di marcatore molecolare in questa tipologia di analisi ha permesso un ulteriore sviluppo di queste ultime (Jones & Ardren, 2003). Infatti, l'impiego di microsatelliti si dimostra rapido, semplice e offre una migliore risoluzione dei risultati (Chambers *et al.*, 2014).

In conclusione, è possibile affermare che l'utilizzo di sequenze minisatelliti per la tecnica di *DNA fingerprinting* ha costituito un esordio determinante relativamente allo sviluppo di metodi di genotipizzazione e di confronto di genomi. Malgrado ciò, a causa degli aspetti critici precedentemente discussi, è stata favorita una maggiore diffusione dei sistemi di ricerca basati sui microsatelliti, i quali risultano vantaggiosi in termini di tempo di allestimento e affidabilità dei risultati (Chambers *et al.*, 2014).

1.3. Microsatelliti: definizione e applicazioni

I microsatelliti sono porzioni del genoma costituite da unità di nucleotidi, in numero da uno a sei, presenti in maniera ripetuta, per questo sono noti anche come

ripetizioni semplici in sequenza (*Simple Sequence Repeats* SSRs) o ripetizioni brevi in tandem (*Short Tandem Repeats* STR) (Guichoux *et al.*, 2011).

Queste sequenze si trovano con alta frequenza nel genoma nucleare nella maggior parte dei taxa (Selkoe & Toonen, 2006), e sono distribuite sia in regioni codificanti che non codificanti (Hoshino *et al.*, 2012). Tuttavia, si è notato che la presenza delle ripetizioni differisce tra le specie. In aggiunta, per quanto riguarda gli organismi animali, la densità di microsatelliti tende ad essere correlata positivamente alla dimensione del genoma; pertanto, se ne riscontra una presenza maggiore nei mammiferi (Ellegren, 2004).

Questi microsatelliti sono considerati tra le sequenze maggiormente variabili nel genoma. Tale polimorfismo deriva principalmente dalla variabilità nella lunghezza, quindi dalla differenza nel numero di ripetizioni delle unità nucleotidiche, e secondariamente da alterazioni nella sequenza nucleotidica. Inoltre, la variazione genica di molti tra questi loci è caratterizzata da elevata eterozigosi e dalla presenza di alleli multipli, in contrasto con altri segmenti di DNA presenti una sola volta (Ellegren, 2004).

In relazione a ciò, queste porzioni polimorfiche presentano un elevato tasso di mutazione (tra le 10^{-2} e 10^{-6} mutazioni per locus per generazione), da cui consegue l'alto livello di diversità allelica. Le sequenze di microsatelliti ripetute mutano frequentemente a causa di errori durante le fasi di *slippage* (scivolamento) e *proofreading* (correzione di bozze) nel processo di replicazione del DNA. Ciò comporta il cambiamento del numero di ripetizioni e pertanto della lunghezza della stringa (Selkoe & Toonen, 2006).

Grazie al loro polimorfismo, i microsatelliti sono stati utilizzati progressivamente e frequentemente a partire dalla fine degli anni Ottanta in qualità di marcatori molecolari. Numerosi sono i campi di applicazione degli SSRs come markers: genetica delle popolazioni, medicina, ambito forense, conservazione, antropologia, evoluzione. Pertanto, nonostante la crescente scoperta di nuove tecniche di genotipizzazione e sequenziamento, i microsatelliti sono stati negli anni i marcatori molecolari maggiormente impiegati nell'indagine della diversità genetica (Hoshino *et al.*, 2012).

Tra le molteplici applicazioni dei microsatelliti nel ruolo di marcatori molecolari, in questo elaborato si porrà maggiore attenzione al loro utilizzo negli studi di determinazione di parentela.

1.4. Analisi di paternità in *Chromis chromis*

1.4.1. *Chromis chromis*

La specie oggetto di questo studio è *Chromis chromis* (Linnaeus, 1758), comunemente nota come Castagnola. È un pesce della famiglia delle Pomacentridae che si trova nel Mar Mediterraneo nello specifico nelle zone rocciose.

In merito alla biologia riproduttiva, è una specie promiscua. Durante la stagione estiva i maschi si riproducono ripetutamente fecondando le uova demersali deposte da diverse femmine. All'interno della popolazione maschile si riscontrano due diverse strategie riproduttive: i maschi definiti territoriali costruiscono ed occupano un nido in cui ricevono uova da diverse femmine, e in seguito alla fecondazione forniscono a tali uova cure parentali; i maschi *sneaker* (opportunisti), invece, fecondano parassitariamente le uova che si trovano in nidi di altri maschi territoriali. La presenza di queste diverse strategie provoca un'alta competizione spermatica che influisce sul successo riproduttivo maschile (Picciulin *et al.*, 2004).

La Castagnola è stata selezionata come modello per questo studio poiché è particolarmente diffusa ed abbondante, inoltre riveste un ruolo chiave per le comunità delle aree costiere in cui vive tramite il trasferimento di nutrienti nell'ambiente pelagico.

1.4.2. Presentazione del problema biologico

La popolazione di *C. Chromis* protagonista della ricerca, condotta da un gruppo della Stazione Zoologica Anton Dohrn, proviene dalle zone rocciose dell'isola di Ustica, nello specifico dal sito di Punta Spalmatore. In quest'area è stato osservato che i maschi nidificano in posizioni solitarie oppure in prossimità di altri gruppi di nidi, ciò implica una diversa densità di nidi. Questa variabilità nella distribuzione può essere dovuta dal punto di vista ecologico da variazioni ambientali riguardanti la temperatura o caratteristiche del substrato.

Data l'elevata competizione dovuta al tipo di strategia riproduttiva, si vuole indagare in che modo la differente densità dei nidi si riflette nel successo riproduttivo dei maschi e come influenza lo sviluppo di tratti che possano aumentare tale successo. Il successo riproduttivo comprende il successo di accoppiamento, ovvero quante uova le femmine depongono nel nido, e successo di fecondazione, corrispondente al numero di uova fecondate dal maschio guardiano del nido.

Si può ipotizzare che in una zona a maggiore densità di nidi, si abbia una maggiore competizione spermatica e di conseguenza si riscontri un maggiore investimento per l'evoluzione di caratteristiche vantaggiose nella riproduzione o nella difesa del nido.

Al fine di definire l'effetto della densità dei nidi sul successo riproduttivo nei maschi territoriali sono state effettuate analisi molecolari su tratti morfologici, fisiologici e comportamentali. In particolare, per valutare il successo di fecondazione sono state eseguite delle analisi genetiche di determinazione di paternità utilizzando microsatelliti con lo scopo di stabilire il numero di uova fecondate dal maschio guardiano all'interno del nido. Lo svolgimento e i risultati di tali analisi sono oggetto di discussione di questo elaborato.

2. Materiali e metodi

2.1. Preparazione dei campioni

Innanzitutto, le uova e gli individui d'interesse sono stati campionati in immersione subacquea sul campo, e poi conservate in Alcool etilico 100° fino al momento dell'estrazione. In seguito all'estrazione, è avvenuta la quantificazione con NanoDrop per determinare la concentrazione di acidi nucleici e proteine. I campioni ottenuti sono stati sottoposti ad amplificazione con la tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction, o Reazione a Catena della Polimerasi) ed infine sequenziati.

In conclusione, sono stati ottenuti i seguenti campioni:

- 20 maschi territoriali da associare alle uova dei rispettivi nidi (denominati con mterr1-20);
- 30 uova circa per ogni nido (denominate con un primo numero che indica il maschio guardiano del nido, e un secondo numero univoco per ogni embrione Es. uova 1.1);
- 30 individui random catturati in natura per un'analisi generale sulla variabilità allelica della popolazione (denominati con pop1-30);
- 30 uova aggiuntive appartenenti ad individui sconosciuti della popolazione, sempre per quantificare la variabilità (denominate con uovapop1-30).

2.2. Scoring dei campioni

I frammenti di microsatelliti ottenuti sono in seguito importati in software specifici in grado di elaborarli e di svolgere la procedura di scoring. In questo studio è stato utilizzato il software GeneMarker v1.95 demo (SoftGenetics, LLC). GeneMarker è un software sviluppato da SoftGenetics LLC e progettato per l'analisi di dati genomici ottenuti solitamente mediante elettroforesi capillare (<https://softgenetics.com/products/genemarker/>).

Il processo di scoring consiste nell'assegnazione di un valore allelico ai picchi. Un picco è definito come la rappresentazione visiva del frammento di DNA analizzato con elettroforesi, e ognuno di essi corrisponde ad un allele di un locus. La posizione e il pattern dei picchi presenti nell'elettroferogramma permettono di determinare il genotipo di ogni campione (Flores-Rentería & Krohn, 2013).

In un primo momento di utilizzo del software, è necessario familiarizzare con i loci d'interesse e determinare un intervallo in cui si possono trovare i picchi per ogni marcatore. In questo studio per ogni campione sono stati considerati 4 loci microsatelliti polimorfici scelti sulla base delle indicazioni della letteratura (FJ225430, FJ225437, FJ225439, FJ225440), ad ognuno dei quali era assegnato un marcatore. Nella **Tabella 1** sono riportate le informazioni inerenti ai loci d'interesse e ai relativi marcatori. In aggiunta, si riporta lo standard di dimensione (*size standard*) che fornisce un riferimento per le dimensioni di frammenti di DNA dei campioni analizzati (**Figura 1**).

Intervallo	Accession number	Marcatore	Colore del picco
Da 360	FJ225430	FAM	Blu
Da 542	FJ225437	YAKYE	Verde
Da 589	FJ225439	ATTO550	Giallo
Da 590	FJ225440	ATTO565	Rosso

Tabella 1: informazioni su loci d'interesse e sui relativi marcatori utilizzati

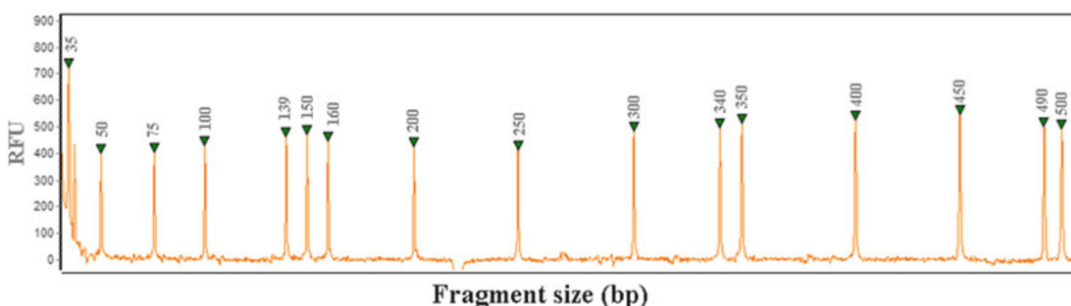


Figura 1: standard di dimensione (*size standard*) LIZ500 in arancione

Successivamente, al fine di determinare correttamente i picchi, è necessario distinguerli da eventuali artefatti dovuti all'amplificazione. Idealmente, un picco appare nell'elettroferogramma come un innalzamento appuntito rispetto alla linea di base e l'altezza del picco rappresenta l'intensità del fluoroforo correlata alla quantità di DNA presente nel campione. Quindi per una maggior accuratezza è necessario considerare i picchi con un'altezza elevata e una forma definita e

simmetrica. Qualora si presentassero degli elettroferogrammi con picchi poco definiti o di dubbia interpretazione, è possibile stabilire un criterio per la scelta che deve essere mantenuto costante per gli altri campioni. Altrimenti sarebbe consigliato ripetere l'amplificazione di tale campione.

Sulla base dei precedenti accorgimenti, è possibile procedere con l'identificazione dei picchi, fase denominata anche *allele calling*. L'assegnazione degli alleli è stata eseguita su un totale di 609 campioni, i quali comprendevano le sequenze di maschi territoriali e delle uova dei rispettivi nidi, le sequenze di individui generici nella popolazione e delle uova sempre della popolazione in generale.

Dal punto di vista pratico, la procedura di *allele calling* consiste nell'identificazione dei picchi e nell'assegnazione dei valori allelici corrispondenti a questi, e così basandosi sugli alleli presenti si determina il genotipo. Ciò avviene per i 4 loci selezionati di ciascun campione.

Essendo la Castagnola un organismo diploide i genotipi generalmente riscontrabili per ogni locus sono due. Nel genotipo omozigote si osserva un solo picco nell'elettroferogramma poiché entrambi gli alleli sono identici, quindi è presente solo un valore. Al contrario, un individuo eterozigote mostra due picchi distinti per il medesimo locus e di conseguenza presenta due valori, uno per ogni allele.

2.3. Raccolta dei risultati

Durante la fase di *allele calling*, il software ha generato una tabella con il genotipo associato al valore dei picchi assegnati. Una volta ottenuti questi valori, sono stati esportati in un foglio di lavoro Excel per facilitare il confronto dei genotipi.

In un primo momento, si è creata una tabella contenente le frequenze alleliche dei maschi territoriali, in modo da poter valutare preliminarmente il grado di variabilità in questi individui.

In un secondo momento, in seguito allo scoring delle sequenze appartenenti alle uova, si è creata una seconda tabella. Questa presentava i valori degli alleli per i quattro loci delle uova, confrontati con quelli appartenenti al maschio guardiano del

nido in cui sono state trovate. Ciò ha permesso una prima rapida analisi delle possibili corrispondenze tra i genotipi.

Successivamente, è stata realizzata un'ulteriore tabella per riportare i genotipi ottenuti dallo scoring degli individui random della popolazione e delle uova sempre della popolazione. Questi ultimi dati permettono di stimare la variabilità allelica per i loci scelti all'interno della popolazione in generale.

2.4. Controllo e correzione

Al termine di una prima analisi di tutti i campioni presenti, è iniziato il processo di controllo. In questa fase si è proceduto innanzitutto ad effettuare nuovamente lo scoring dei campioni dubbi e poco chiari, in modo da poter correggere eventuali errori. Nel caso in cui alcuni dati fossero rimasti difficilmente interpretabili o presentassero anomalie (per esempio un genotipo con tre alleli), sono stati evidenziati ed è stata indicata la motivazione riguardante la criticità di assegnazione del valore allelico.

In aggiunta, durante il controllo con il secondo scoring, è stata svolta un'analisi conservativa dei valori allelici. Tale procedura ha lo scopo di minimizzare gli errori dovuti alla raccolta e all'interpretazione dei dati, evitando di sovrastimare, o al contrario, di sottostimare la variabilità degli alleli. In questo modo, si intende mantenere l'integrità dei dati al fine di ottenere risultati che rappresentino il più accuratamente possibile i reali profili genici.

Concludendo con questo ultimo passaggio, è stata stilata una tabella riassuntiva.

3. Discussione dei risultati

3.1. Analisi ed interpretazione

In questo capitolo sono presentati i risultati ottenuti e le conclusioni che ne conseguono in relazione al problema biologico esposto in principio.

Considerando i dati, il primo aspetto che emerge è la carenza dei dati stessi, poiché molti dei campioni forniti risultano illeggibili. La scarsa amplificazione di questi non ha reso possibile l'assegnazione di valori allelici nella fase di scoring.

È stato realizzato un grafico al fine di visualizzare agevolmente le proporzioni tra i campioni iniziali e quelli leggibili (*Grafico 1*).

Nel grafico sull'asse delle ascisse sono presenti i nidi analizzati (numerati da 1 a 10) e per ognuno sono presenti due colonne. La prima rappresenta il numero di campioni a cui è stato possibile assegnare un valore per i picchi (in blu). La seconda mostra il numero di campioni tra quelli effettivamente analizzati in cui emerge una corrispondenza per i quattro loci tra il maschio territoriale e le uova del rispettivo nido (in verde).

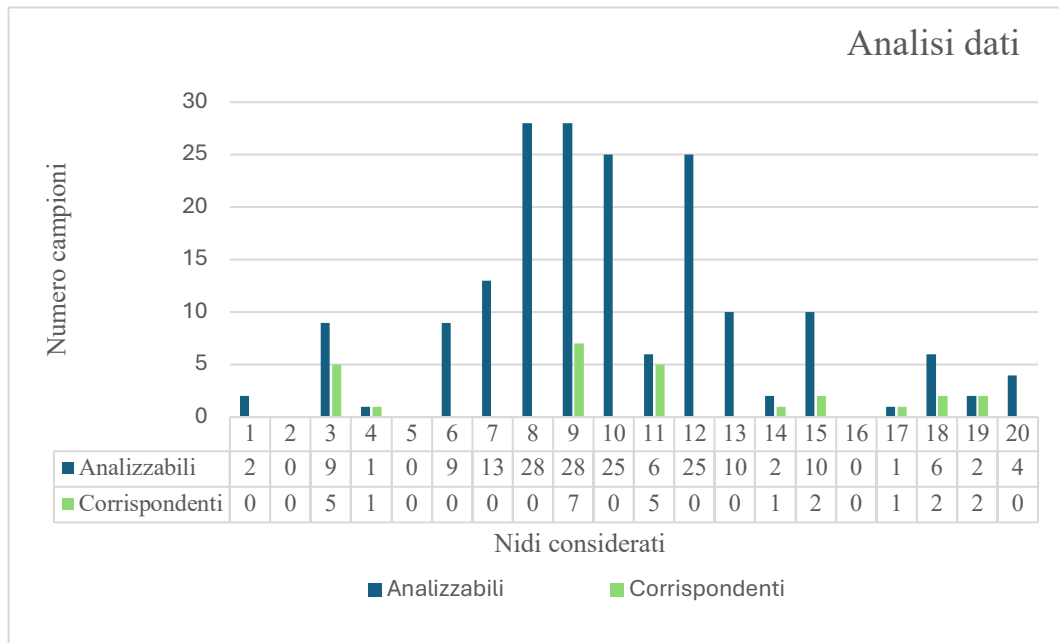


Grafico 1: presentazione riassuntiva per ogni nido dei campioni di uova effettivamente analizzati (colonna blu) e dei campioni che presentano una corrispondenza in 4 loci tra uova e maschio territoriale (colonna verde).

Ponendo l'attenzione sulle colonne in blu, è facilmente osservabile l'elevata variabilità del numero di campioni leggibili per i diversi nidi. Per ciascun nido erano state inizialmente fornite le sequenze di 30 uova, ma per nessuno di questi risultano analizzabili nella totalità. Per la maggior parte dei nidi si ha una scarsa rappresentanza del quadro genetico. Al contrario, considerando le colonne in verde, si può comunque notare che i campioni, i quali presentano una corrispondenza completa padre-figlio, sono in numero ridotto, anche nei nidi in cui si ha una quota di campioni significativa. Questi individui potrebbero essere considerati prole appartenente al maschio guardiano del nido in cui sono stati trovati con un buon grado di certezza secondo i presupposti dell'esperimento.

Nonostante questa valutazione, l'impossibilità di assegnare dei valori a gran parte delle sequenze risulta limitante. In assenza delle sequenze non è possibile da un lato stabilire se gli individui in questione siano figli del maschio guardiano, e dall'altro escludere che siano prole dei maschi sneaker. Dunque, non è possibile ottenere una statistica affidabile che metta in evidenza la percentuale dei figli per i diversi nidi.

3.2. Problemi riscontrati

Una delle principali criticità riscontrate in questo studio riguarda l'incompletezza dei dati. Durante il processo di scoring, l'assegnazione del genotipo si è rivelata complessa per la maggior parte delle sequenze fornite. In molti casi, gli elettroferogrammi apparivano poco precisi e di dubbia interpretazione, rendendo difficile l'identificazione dei picchi e la conseguente assegnazione dei valori allelici agli individui.

La mancata o scarsa amplificazione dei campioni potrebbe essere stata causata dalla limitata quantità di DNA estratto, a sua volta influenzata dal metodo di campionamento. Infatti, i campioni sono stati prelevati sul campo. In un contesto naturale le condizioni dell'ambiente e la qualità dei campioni sono fattori complessi da monitorare. Ad esempio, nel caso delle uova è stato complicato determinare il loro stadio di sviluppo per valutare se contenessero una quantità sufficiente di DNA. Pertanto, l'estrazione del genoma in una fase precoce ha fornito materiale genetico quantitativamente e qualitativamente poco adeguato.

In aggiunta a quanto appena discusso, è necessario considerare i possibili errori dell'operatore durante l'esecuzione delle procedure oppure ulteriori variabili non prevedibili.

3.3. Considerazioni finali

Alla luce di quanto emerso dall'esame dei risultati presentati in questo elaborato, è possibile affermare che i dati ottenuti dall'analisi dei microsattelliti non sono utili allo studio in questione.

Essi, come riscontrato in precedenza nella discussione, risultano incompleti ed imprecisi. Pertanto, non costituiscono una base affidabile per ricavare la percentuale relativa al successo di fecondazione. Il successo di fecondazione costituisce un parametro chiave per affrontare il problema biologico. Nella ricerca, quindi, saranno impiegati unicamente i dati ricavati dallo studio della componente comportamentale.

In conclusione, non è possibile determinare con certezza come l'effetto della competizione sessuale dovuta alla diversa densità di nidi si rifletta nello sviluppo di tratti pre-copulatori in *C. chromis*. In queste circostanze è possibile solamente avanzare delle ipotesi in risposta a questo quesito.

Tuttavia, è consigliabile ripetere il processo di campionamento in condizioni controllate e ciò potrebbe contribuire alla produzione di campioni attendibili. In questo modo si potrebbe ripetere lo studio formulando delle conclusioni maggiormente solide per affrontare la questione biologica indagata in partenza.

Bibliografia

Chambers, G.K., Curtis, C., Millar, C.D. et al. (2014). "DNA fingerprinting in zoology: past, present, future." *Investigative Genetics*, 5(3), 1-11.

<https://doi.org/10.1186/2041-2223-5-3>

Ellegren, H. (2004). "Microsatellites: simple sequences with complex evolution." *Nature Reviews Genetics*, 5, 435-445.

<https://doi.org/10.1038/nrg1348>

Flores-Rentería, L., Krohn, A. (2013). "Scoring Microsatellite Loci." *Microsatellites: Methods and protocols*. In: Kantartzi, S. (eds) *Microsatellites. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, vol 1006, 319-336.

https://doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_21

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R. J. (2011). "Current trends in microsatellite genotyping." *Molecular ecology resources*, 11(4), 591-611.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x>

Hoshino, A. A., Bravo, J. P., Nobile, P. M., & Morelli, K. A. (2012). "Microsatellites as tools for genetic diversity analysis." *Genetic diversity in microorganisms*, 2, 64.

<http://dx.doi.org/10.5772/35363>

Jones, A.G., Ardren, W.R. (2003). "Methods of parentage analysis in natural populations." *Molecular Ecology*, 12, 2511-2523.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01928.x>

Picciulin, M., Verginella, L., Spoto, M., & Ferrero, E. A. (2004). "Colonial nesting and the importance of the brood size in male parasitic reproduction of the Mediterranean damselfish *Chromis chromis* (Pisces: Pomacentridae)." *Environmental Biology of Fishes*, 70, 23-30.

<https://doi.org/10.1023/B:EBFI.0000022851.49302.df>

Selkoe, K. A., 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>

Sitografia

GeneMarker Version 1.95 demo. *Software di analisi genotipiche*. Sito consultato il 22 Luglio 2024, da <https://softgenetics.com/products/genemarker/>

