



Università Degli Studi Della Tuscia Di Viterbo

Dipartimento Di Produzioni Animali

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE BIOLOGICHE
XXII CICLO**

**I Marcatori Microsatelliti per l'Indagine di Popolazioni
Animali Moderne e Antiche**

AGR/17

Coordinatore:

Dott. Roberta Cimmaruta

Tutor:

Prof. Alessio Valentini

Dottorando: Maria Gargani

1. Introduzione	6
1.1. Genetica di popolazione	6
1.1.1. La deriva genetica	6
1.1.2. Inbreeding.....	7
1.1.3. La selezione.....	8
1.1.4. La struttura delle popolazioni e flusso genico.....	10
1.2. Marcatori molecolari.....	10
1.3. Microsatelliti	14
1.3.1. Struttura dei microsatelliti	14
1.3.2. Dinamica evolutiva	16
1.3.3. Meccanismi e tassi di mutazione.....	16
1.3.4. Modello di mutazione.....	17
1.3.5. Vantaggi e svantaggi dei microsatelliti	20
1.4. I microsatelliti negli studi di genetica e conservazione animale.....	21
2. Finalità della ricerca	23
3. Analisi di microsatelliti in diverse popolazioni di bufali provenienti dalla Turchia.....	25
3.1. Caratteristiche e distribuzione dei bufali della Turchia (Anatolian buffalo)	25
3.2. Materiali e metodi.....	29

3.2.1.	Campionamento ed estrazione del DNA.....	29
3.2.2.	Scelta e genotipizzazione dei microsatelliti	31
3.2.3.	Elettroforesi capillare	33
3.2.4.	Analisi statistiche	35
3.2.4.1.	Stime di variabilità genetica	35
3.2.4.2.	Equilibrio di Hardy-Weinberg	36
3.2.4.3.	Il linkage disequilibrium, ...	36
3.2.4.4.	Statistiche F di Wright.....	36
3.2.4.5.	Amova	37
3.2.4.6.	Equilibrio mutazione deriva (Bottleneck).....	37
3.2.4.7.	Analisi delle componenti principali (PCA).....	38
3.2.4.8.	Analisi Bayesiana (Structure).....	38
3.3.	Risultati.....	39
3.3.1.	Indici di diversità genetica	39
3.3.2.	Equilibrio di Hardy-Weinberg	45
3.3.3.	Linkage disequilibrium	46
3.3.4.	Componenti della variabilità genetica.....	46
3.3.5.	Bottleneck.....	48
3.3.6.	Struttura delle popolazioni (PCA).....	48
3.3.7.	Structure	49
3.4.	Discussione	51
4.	Analisi di microsatelliti in resti bovini risalenti al Medioevo.....	53
4.1.	Studio del DNA antico.....	53
4.1.1.	Degradazione del DNA	54

4.1.2.	Contaminazione del DNA	56
4.1.3.	DNA nucleare e DNA mitocondriale	59
4.1.4.	Applicazioni dello studio del DNA antico	60
4.2.	Obiettivo	64
4.3.	Materiali e metodi.....	65
4.3.1.	Campionamento	65
4.3.2.	Estrazione DNA	66
4.3.3.	Scelta dei microsatelliti	68
4.3.4.	PCR	68
4.3.5.	Elettroforesi capillare e visualizzazione dei prodotti di PCR	70
4.3.6.	Autenticazione del DNA	71
4.3.7.	Database dei bovini moderni.....	72
4.3.9.	Analisi statistiche	75
4.3.9.1.	Indici di diversità genetica	75
4.3.9.3.	Likelihood	75
4.3.9.4.	Analisi delle componenti principali (PCA).....	76
4.4.	Risultati.....	77
4.4.1.	Resa di estrazione del DNA	77
4.4.2.	Tassi di amplificazione.....	78
4.4.3.	Analisi statistiche	81
4.4.4.	Indici di diversità genetica	81
4.4.6.	Likelihood	81
4.4.7.	PCA	84
4.5.	Discussione	86

Bibliografia	89
---------------------------	-----------

1. Introduzione

1.1. Genetica di popolazione

La genetica di popolazione ha lo scopo di descrivere la struttura della variabilità genetica delle popolazioni e di determinare le forze evolutive che l'hanno formata. Questo approccio è fondamentale per una corretta comprensione dell'evoluzione, definibile come l'insieme dei cambiamenti progressivi che subiscono le frequenze alleliche nelle popolazioni (Hedrick 2005). Gli studi di genetica di popolazione hanno due principali finalità: misurare la quantità di variazione genetica esistente nelle popolazioni e spiegare come questa viene originata e mantenuta, nonché quale sia la sua importanza dal punto vista ecologico ed evoluzionistico (Hedrick 2005). Uno dei concetti di base della genetica di popolazione è il principio di Hardy-Weinberg il quale sancisce che, se sulla popolazione considerata non agiscono forze esterne, la frequenza relativa dei diversi alleli e quella dei diversi genotipi rimangono costanti col passare delle generazioni. Per questo si parla di anche di equilibrio di Hardy-Weinberg.

L'equilibrio di Hardy-Weinberg si verifica se:

- la popolazione è infinitamente grande (assenza di deriva genetica)
- gli incroci avvengono completamente a caso (popolazione panmittica)
- gli individui non differiscono tra loro per il tasso di riproduzione e la capacità riproduttiva (assenza di selezione)
- gli alleli sono del tutto stabili (assenza di mutazione)
- non c'è migrazione.

Nelle popolazioni reali però molte forze evolutive quali il flusso genico, la mutazione, la deriva genetica, l'inbreeding e la selezione influiscono nel modificare le frequenze alleliche nel corso delle generazioni.

1.1.1. La deriva genetica

La deriva genetica è la variazione delle frequenze alleliche dovuta a fluttuazioni casuali ed opera in tutte le popolazioni di dimensioni finite. Il ruolo della deriva è tanto più importante nel modificare le frequenze alleliche quanto più piccole sono le dimensioni della popolazione. L'effetto della deriva genetica è quello di abbassare la variabilità genetica portando ad una riduzione dell'eterozigotità. Nelle piccole popolazioni le frequenze alleliche non sono stabili nel tempo, gli

alleli più rari vengono persi e quelli più comuni sono fissati. La fissazione degli alleli avviene indipendentemente dal loro valore adattativo perché è guidata dalla deriva casuale e non dalla selezione naturale. Secondo Motoo Kimura (1968), autore della teoria della "neutralità selettiva" dell'evoluzione a livello della struttura del DNA e delle proteine, nella deriva genetica non c'è la sopravvivenza del più adatto bensì quella del più "fortunato".

Molte popolazioni naturali subiscono grandi fluttuazioni nel numero di individui e sono sottoposte a periodi di massima espansione (aumento numerico di individui) e di contrazione (diminuzione numerica degli individui). In occasione di tali periodi, una popolazione naturale può diventare anche molto piccola e produrre un cosiddetto effetto "a collo di bottiglia" (population bottle-neck).

La perdita di variabilità genetica che si verifica a seguito di fenomeni di "collo di bottiglia" e di conseguente deriva genetica, dipende anche dalla velocità con cui le popolazioni che li hanno subiti sono capaci di ripristinare le dimensioni originali; la perdita risulta, comunque, poco significativa nel caso di un rapido recupero da parte della popolazione. Al contrario, popolazioni caratterizzate da ridotte dimensioni per un lungo periodo di tempo subiscono generalmente variazioni casuali nel loro pool genico e persino fissazione e perdita di alcuni alleli. In particolare popolazioni che risultino "cronicamente" piccole possono continuamente perdere alleli e conseguentemente variabilità genetica: in definitiva la durata del "collo di bottiglia" gioca un ruolo determinante nella dinamica delle popolazioni naturali e nella loro variazione (Hoelzel 1999)

Wright (1929), ad esempio, ha stimato che una popolazione di ridotte dimensioni (20 individui) può raggiungere la condizione omozigote in circa 200 generazioni, una di 50 individui in 500, ed una di 1000 può conservare per lo stesso tempo una variabilità pari a circa il 95% di quella originale. Inoltre la durata del "collo di bottiglia" e la conseguente caduta di variabilità genetica possono risultare sfavorevoli soprattutto per quanto riguarda le capacità da parte di una popolazione di reagire ad eventi negativi, quale ad esempio un'epidemia (Fisher 1930)

Molti studi condotti sulle popolazioni naturali hanno dimostrato che il collo di bottiglia è coinvolto in deficit di eterozigoti (Nei & Graur 1984), in ridotti livelli di variabilità genetica (Groombridge *et al.* 2000) e in eventi di speciazione (Slakhtin 1996).

1.1.2. Inbreeding

Un altro fattore in grado di cambiare le frequenze alleliche è l'**inbreeding**. In una popolazione aperta gli accoppiamenti tra gli individui avvengono in modo casuale. In una popolazione isolata, gli accoppiamenti avvengono tra individui che sono legati da relazioni di parentela più o meno

strette e che quindi presentano uno o più antenati in comune. La progenie derivante da accoppiamenti che avvengono in una popolazione isolata, è una popolazione inbred. Il livello di inbreeding presente in una popolazione viene determinato attraverso il calcolo del coefficiente di inbreeding, definito come la probabilità che in un individuo due alleli ad un locus siano identici per discendenza (IBD, Identical By Descendant) da un comune antenato ossia siano in una condizione di autozigosi (al contrario si definiscono allozigoti due alleli in omozigosi identici per stato, cioè che derivano da progenitori diversi). Il coefficiente di inbreeding (F) misura il grado di autozigosità rispetto alla popolazione ancestrale, descrivendo la variazione delle frequenze alleliche in presenza di inbreeding nella formula di Hardy-Weinberg. Proprio da questa formula F è stato estrapolato nella sua prima espressione da Sewall Wright nel 1922. In questo modo F diventa una misura della riduzione di eterozigosità rispetto ad una popolazione panmittica. L'inbreeding aumenta l'omozigosità e quindi la possibilità per i caratteri recessivi di manifestarsi. L'inbreeding può quindi causare la segregazione di un carico di genotipi recessivi deleteri, che vengono persi nel lungo periodo poiché conferiscono una ridotta fitness agli individui che li possiedono. In presenza di inbreeding si ha una riduzione della diversità allelica, a causa del modesto pool genico degli individui componenti la popolazione. Questa condizione porta ad una riduzione della capacità degli individui di adattarsi ai cambiamenti ambientali e di conseguenza si assiste ad una diminuzione della fitness individuale (Lande 1988) e del tasso di sopravvivenza. Questo fenomeno noto come depressione da inbreeding è ben conosciuto in tutte le specie di allevamento. L'uso dell'inseminazione artificiale, che offre la possibilità di ottenere da un singolo genitore una progenie molto numerosa, è una tecnica molto diffusa negli allevamenti di bovini ed è il principale metodo di riproduzione in molte razze del mondo (Taberlet *et al.* 2008). L'inseminazione artificiale, quindi, abbassa la variabilità genetica ed aumenta i valori di inbreeding. Nelle specie allevate è ben documentato l'effetto negativo dell'inbreeding sulla fertilità (Thompson 2000; Mc Parland 2007), sulla sopravvivenza (Thompson 2000; Sewalen 2006) e sulla produzione di latte (Mc Parland 2007). Nella razza Holstein, ad esempio, la diminuzione della produzione di latte dovuta a inbreeding può variare da -29,6 a -19,7 Kg per punto percentuale di inbreeding (Croquet *et al.* 2006). Le conoscenze e gli studi di genetica di popolazioni possono ridurre i danni procurati dalla perdita di variabilità attraverso lo sviluppo di appropriati programmi di gestione per le popolazioni a rischio.

1.1.3. La selezione

Il concetto di **selezione** naturale fu introdotto per la prima volta da Darwin nel 1859 nell'origine della specie. Secondo Darwin la selezione è un meccanismo evolutivo che tende a premiare gli

individui che meglio si adattano all'ambiente in cui vivono. All'interno di una popolazione gli individui differiscono tra loro per le caratteristiche genetiche e quindi fenotipiche. Questa variabilità è causata principalmente dalle mutazioni genetiche casuali. La selezione favorisce gli individui che portano quelle varianti che conferiscono loro una maggiore capacità di adattarsi e di sopravvivere nell'ambiente. Gli individui meglio adattati ad un certo habitat si procureranno più facilmente il cibo e si accoppieranno più facilmente degli altri individui della stessa specie che non presentano tali caratteristiche. I geni che portano un vantaggio adattativo verranno trasmessi alla progenie e con il susseguirsi delle generazioni si potrà avere una affermazione di tali geni. Numerosi studi hanno evidenziato che l'evoluzione adattativa agisce su un numero di importanti molecole coinvolte in diversi processi quali la riproduzione, lo sviluppo e il sistema immunitario. In uno studio del 2004 condotto da Lynn e collaboratori, è stato dimostrato che le alpha-defensine, famiglia di peptidi che nei mammiferi hanno una funzione antimicrobica, sono sotto pressione selettiva per evolvere in risposta alle diverse infezioni degli agenti microbici. In particolare hanno evidenziato che 14 siti amminoacidici localizzati tutti nella struttura matura del peptide, erano selezionati positivamente. Un altro esempio è quello dei geni del complesso maggiore di istocompatibilità coinvolti anche essi nella difesa dagli agenti patogeni. Solo la selezione naturale può spiegare l'estrema diversità genetica dei geni del complesso maggiore di istocompatibilità (Garrigan & Hedrick, 2003).

La selezione artificiale è contrapposta alla selezione naturale. È un metodo molto antico operato dall'uomo per ottenere individui con caratteristiche utili ad un determinato scopo. Una delle differenze principali tra le due è che la selezione artificiale porta alla creazione di razze o qualità, mentre la selezione naturale è responsabile della biodiversità a tutti i livelli tassonomici. In alcune specie si verifica la selezione artificiale ad opera dell'uomo. Tra gli animali domestici, i bovini sono tra le specie che hanno subito una maggiore selezione artificiale dopo la domesticazione. I dati archeologici e genetici suggeriscono che la domesticazione del *Bos. taurus* è avvenuta 10 milioni di anni fa nella mezza luna fertile (Edwards *et al.* 2007, Loftus *et al.* 1994). Da allora i bovini sono andati incontro a diverse pressioni selettive. Oggetto della selezione sono i caratteri a variazione continua o quantitativi, come l'altezza, la velocità di accrescimento, l'aumento della produzione del latte, l'aumento della quantità di carne; con la selezione si ha un accorciamento dei tempi di miglioramento in quanto gli animali vengono scelti e fatti accoppiare. Per esempio la selezione per una migliore capacità di allattamento, soprattutto negli ultimi 5000 anni, ha portato ad un incremento nella produzione del latte. Questa selezione è aumentata moltissimo per alcune razze come la Holstein.

1.1.4. La struttura delle popolazioni e flusso genico.

Ogni specie è costituita da un certo numero di popolazioni che sono distribuite sul territorio in maniera eterogenea. Ogni specie, infatti, vive, dove trova parcelle di ambiente adatto, con fonti alimentari sufficienti. Gli ambienti naturali sono discontinui in conseguenza alle barriere geografiche (mari, fiumi, montagne) e alle variazioni climatiche. Gli interventi umani, inoltre, hanno aumentato la frammentazione degli ambienti naturali. La struttura geografica ha conseguenze sulla distribuzione della variabilità genetica entro e tra le popolazioni. La diversità genetica totale (H_t) di una specie composta da popolazioni frammentate è divisa in una parte di variabilità entro le popolazioni (H_i) e una quota di variabilità tra le popolazioni (H_s). Sewall Wright nel 1965 introdusse la statistica “F” per rappresentare la struttura di una popolazione e la sua suddivisione in sottopopolazioni.

FST è la proporzione della varianza genetica totale contenuta in una sottopopolazione (l'indice S) rispetto alla varianza della popolazione totale (l'indice T). I valori possono variare da 0 a 1. Un alto valore dell’FST implica un notevole grado di differenziazione tra le popolazioni.

Altri due indici sono F_{is} e F_{it} che rappresentano la correlazione tra due alleli prelevati da una popolazione in relazione rispettivamente ad una sottopopolazione e all’intera popolazione (Hartl & Clark 1993).

Il flusso genico influenza la struttura genetica di una popolazione e la dinamica di metapopolazione (Chepko-Sade & Halpin 1987; Colbert *et al.* 2001). Dispersione e flusso genico contribuiscono anche a conservare la diversità genetica, permettendo alle popolazioni di rispondere alle mutevoli condizioni ambientali. La perdita e la frammentazione di habitat può portare a ridurre il flusso genico tra le piccole popolazioni frammentate e una conseguente diminuzione della diversità genetica all'interno delle restanti popolazioni (Frankham *et al.* 2002; Garner *et al.* 2005). Poiché la diversità genetica è correlata con la fitness delle popolazioni (Reed & Frankham 2003), la comprensione dei modelli di flusso genico e di dispersione è necessaria per la conservazione della vita selvatica in ambienti frammentati.

1.2. Marcatori molecolari

I marcatori molecolari rappresentano caratteristiche ereditabili e polimorfiche a livello di specie, di popolazioni e di individui. Un marcatore molecolare è un qualsiasi locus cromosomico le cui varianti alleliche possono essere identificate facilmente analizzando direttamente il DNA. Un buon

marcatore molecolare deve essere polimorfico, codominante, facilmente individuabile, ripetibile e possedere un meccanismo di trasmissione semplice (mendeliano o uniparentale).

I primi marcatori ad essere utilizzati sono stati gli **allozimi** che sono forme diverse di una proteina. Se una mutazione porta ad una sostituzione amminoacidica nella proteina, si può determinare una variazione della carica elettrica della stessa che quindi avrà una mobilità diversa se sottoposta ad elettroforesi. In questo modo l'elettroforesi consente di evidenziare varianti alleliche cioè proteine enzimatiche prodotte ad un locus ma con differente carica elettrica. I limiti dell'elettroforesi derivano principalmente dalla scarsa variabilità di questi marcatori che ormai sono quasi stati del tutto sostituiti dai marcatori che vanno ad evidenziare i polimorfismi direttamente al livello della sequenza del DNA.

Negli ultimi decenni infatti i progressi nella biologia molecolare tra cui lo sviluppo della tecnica della PCR (Mullis & Faloona, 1987), hanno contribuito allo sviluppo di nuovi marcatori molecolari. I principali marcatori che si basano sulla tecnologia PCR sono i microsatelliti (Weber & May, 1989), i RAPD (*Random Amplification Polymorphic DNA*, Williams *et al.*, 1990), gli AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, Vos *et al.*, 1995) e gli SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, Landegren *et al.*, 1998), mentre gli RFLP sono basati sul taglio con enzimi di restrizione.

Gli **RFLP** (Botstein *et al.*, 1980) sono i polimorfismi nella lunghezza dei frammenti di restrizione. I polimorfismi sono identificati mediante restrizione del DNA con endonucleasi che agiscono riconoscendo e tagliando una specifica sequenza nucleotidica e producendo una serie di frammenti diversi tra loro in lunghezza. Mutazioni puntiformi, (che alterano la sequenza del DNA) o fenomeni di inserzione/delezione creano o distruggono il sito riconosciuto dall'enzima, dando origine ad un diverso profilo di restrizione del genoma e ad alleli di lunghezza differente. La tecnica RFLP consente di distinguere i diversi alleli del marcatore molecolare, di seguirne la segregazione in una popolazione scelta e di distinguere gli individui omozigoti dagli individui eterozigoti, per questo motivo sono detti "codominanti".

I marcatori **RAPD** sono analizzati tramite PCR utilizzando primers a sequenza casuale della lunghezza di circa 10 - 12 paia di basi. I frammenti ottenuti dopo l'amplificazione vengono visualizzati attraverso una corsa elettroforetica su gel d'agarosio. Il numero dei prodotti di amplificazione generati dalla PCR con primer arbitrari dipende dalla presenza di omologia tra DNA genomico e primer e/o la loro relativa affinità, mentre l'assenza di un particolare frammento può derivare da delezioni, inserzioni o mutazioni di basi nel DNA stampo a livello dei siti di legame del primer o nel segmento da essi delimitato. Tuttavia a causa dell'utilizzo di primer a sequenza

casuale, la reazione di amplificazione PCR è condotta a bassa stringenza, causando problemi di ripetibilità (Saunders *et al.*, 2001). Inoltre nonostante questa tecnica sia semplice ed economica, la sua limitazione è quella di non poter distinguere gli omozigoti dagli eterozigoti. Alcuni studi (Schierwater & Ender 1993, Valentini *et.al* 1997) hanno evidenziato come diverse DNA polimerasi producono diversi marcatori RAPD e che questa tecnologia non sia affidabile per studi di diversità.

La tecnica **AFLP** prevede una fase di restrizione enzimatica del DNA e una fase di amplificazione tramite PCR. Nello specifico i frammenti ottenuti dalla digestione vengono legati a degli adattatori e successivamente amplificati con primer specifici (complementari agli adattatori e con nucleotidi selettivi a una estremità). Questa tecnologia genera una miscela di frammenti che vengono separati ed identificati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide o di sequenza. Anche questi marcatori come i RAPs sono dominanti (Vos *et al.* 1995). I polimorfismi osservati derivano principalmente da mutazioni puntiformi nei siti riconosciuti dagli enzimi o dalle basi selettive dei primer (polimorfismo di sequenza). Il vantaggio di questo metodo è che permette di analizzare numerosi loci in un unico esperimento e non richiede informazioni sulla sequenza del genoma che viene sottoposto ad analisi. I marcatori AFLP possono essere utili per lo studio di specie e popolazioni di cui non si hanno informazioni a livello genomico e hanno potere discriminante per quanto riguarda le razze e gli individui (Ajmone Marsan *et al.* 1997)

I marcatori **SNP** (*Single Nucleotide Polymorphism*) identificano polimorfismi di singoli nucleotidi come mutazioni puntiformi, ma anche corte inserzioni e delezioni nella sequenza del DNA. Gli SNP sono molto abbondanti (nell'uomo costituiscono più del 90% del polimorfismo totale), frequenti e distribuiti casualmente nel genoma. La maggior parte degli SNP risiede nelle regioni non codificanti in cui la probabilità di trovare una mutazione puntiforme è 4 volte maggiore rispetto a quella di trovarla in regioni codificanti (Twyman & Primrose, 2003). E' inoltre stato determinato che metà delle mutazioni presenti nelle sequenze espresse sono sinonime (non portano a cambiamenti nella sequenza aminoacidica). Gli SNPs sono considerati marcatori biallelici in quanto la probabilità che nella stessa posizione ci siano 2 - 3 cambiamenti di base è minima (nei mammiferi ogni polimorfismo è generato da sostituzioni che avvengono con una ricorrenza di $1 - 5 \times 10^{-9}$ per anno) (Vignal *et al.*, 2002) e codominanti (consentono la discriminazione degli individui omozigoti da quelli eterozigoti).

Le tecniche per individuare i polimorfismi SNP sono diverse tra cui il sequenziamento del frammento che porta la mutazione, la SSCP (*single strand conformation polymorphism*) che permette di visualizzare su gel le variazioni di singola base, il DHPLC (Wolford *et al.*, 2000) che sfrutta la denaturazione e rinaturazione del DNA e il Maldi - TOF (*matrix - assisted laser*

desorption/ionization time - of - flight, Ross *et al.* 2000.). La tipizzazione degli SNP può essere molto veloce e automatizzata se si avvale di apparecchiature come DHPLC, Maldi - TOF e Pyrosequencing (Nordstrom *et al.*, 2000); tuttavia sono ancora molto sfruttate tecniche meno complesse, che si basano sulla PCR, quali la PCR - RFLP e il *minisequencing* (Pastinen *et al.*, 1997). Recentemente sono utilizzate inoltre tecnologie *highthroughput* per l'identificazione di centinaia di SNP simultaneamente, basate sull'ibridazione come il BeadArray (Shen R. *et al.*, 2005) o decine di migliaia fino a milioni con il Bead-chip (Illumina).

Questi marcatori sono utilizzati per studi evolutivi (Morin *et al.*, 2004), ma anche mappatura e associazione con QTL (Vignal *et al.*, 2002). Nelle razze di allevamento inoltre vengono usati per studi sulla tracciabilità e rintracciabilità di razza. Nell'uomo sono impiegati in studi di associazione con malattie (Rebbbeck *et al.*, 2004) e per la ricerca di geni sotto pressione selettiva (Sabeti *et al.*, 2002).

Il **DNA mitocondriale** (mtDNA) è un marcatore uniparentale in quanto viene ereditato esclusivamente per via materna; è presente in centinaia di copie per cellula ed ha la caratteristica di non subire ricombinazione e di evolvere 10 volte più velocemente del DNA nucleare. L'evoluzione dei geni mitocondriali varia da regione a regione: i geni del DNA ribosomale sono altamente conservati e possono essere utilizzati per analisi filogenetiche di taxa superiori fino ai phyla, la regione non codificante detta *control region* (contenente il *displacement loop* o *D-loop* e l'origine di replicazione) è molto più variabile non essendo soggetta a pressione selettiva e viene perciò usata in studi sulla struttura di popolazioni e razze (per esempio per studiare la diversità e la "filogeografia" delle specie allevate, Sultana *et al.*, 2003). I marcatori **mitocondriali** sono amplificati tramite PCR e successivamente sequenziati. I dati ottenuti dal sequenziamento vengono allineati con appropriati programmi bioinformatici. I marcatori mitocondriali sono stati utilizzati per identificare gli eventi di domesticazione (Bruford *et al.*, 2003); per esempio è stato possibile distinguere due separati episodi di domesticazione nel bovino (Loftus *et al.*, 1994) e multipli per il suino (Larson *et al.*, 2005) e determinare la struttura delle sottospecie europee e africane *Bos taurus* e *Bos indicus* (Bradley *et al.*, 1996). Negli studi di popolazioni in cui sono diffusi i fenomeni di introgressione e di flusso genico mediato dagli individui maschi, le analisi con i marcatori mitocondriali, che considerano l'eredità solo dal punto di vista della linea femminile, forniscono meno informazioni (MacHugh *et al.*, 1997).

I **microsatelliti** sono sequenze ripetute in tandem e rappresentano una classe di marcatori molto utilizzati per lo studio della struttura genetica delle popolazioni a causa del loro elevato polimorfismo. Di seguito verranno analizzate le caratteristiche di questi marcatori.

1.3. Microsatelliti

I microsatelliti o simple sequence repeats SSR, sono stati ben caratterizzati nelle cellule eucariotiche in questi ultimi 15 anni. Essi sono formati da motivi nucleotidici ripetuti in tandem, costituiti da minimo una coppia di basi a massimo sei. Grazie alla tecnica della PCR, realizzata nel 1980, i microsatelliti sono i marcatori più utilizzati negli studi di alcune malattie genetiche, nei programmi di mappatura genetica e, dai biologi di popolazione, per studi sulla struttura genetica di popolazione. L'uso dei microsatelliti come marcatori genetici è vantaggioso perchè sono abbondanti ed hanno un elevato tasso mutazionale, che è di rilevante importanza per la comprensione dell'evoluzione del genoma (Tautz *et al.* 1986; Kashi *et al.* 1997; Dodgson *et al.* 1997). Tuttavia, nonostante i vantaggi, i microsatelliti presentano svantaggi come l'omoplasia, i tassi di mutazione e la neutralità. Inoltre sono genere-specifici o specie-specifici e dunque isolarli non è facile e richiede tempo e denaro. Quale sia l'origine dei microsatelliti non è del tutto chiara. Per la loro presenza nei genomi degli eucariotici e proprio per le loro specifiche caratteristiche, i microsatelliti sono, oggi, tra i marcatori più usati per studi di struttura genetica di popolazioni (Bachtrog *et al.* 2000; Bonizzoni *et al.* 2000; Strassmann *et al.* 2000; Vargo 2000).

1.3.1. Struttura dei microsatelliti

I microsatelliti sono delle sequenze nucleotidiche costituite da motivi ripetuti in tandem di 1-6 paia di basi. Essi sono stati trovati nei genomi eucariotici in regioni codificanti e non codificanti. Ogni motivo è costituito da un determinato numero di nucleotidi, l'insieme dei motivi genera una famiglia di SSR. Il motivo formato dallo stesso nucleotide ripetuto è chiamato mononucleotide, quello formato da due nucleotidi è chiamato di-nucleotidico [es. (AG)], quello da tre trinucleotidico [es. (ATG)], quattro tetra-nucleotidico [es. (TAGA)], cinque penta-nucleotidico [es. (AAAAT)] e sei esanucleotidico [es. (CCCAA)]j.

I microsatelliti possono essere classificati, in base alla loro struttura, in tre famiglie:

MICROSATELLITI PURI (CACACACACACACACA)

MICROSATELLITI COMPOSTI (CACACACAGAGAGAGA)

MICROSATELLITI INTERROTTI (CACATCACATTCATTCA).

I microsatelliti puri sono formati da un unico tipo di unità ripetuta n volte; quelli composti sono costituiti da due o più motivi ripetuti ciascuno n volte e quelli interrotti sono costituiti da un'unità ripetuta e interrotta da motivi di DNA di più paia di basi. Le ripetizioni composte da due-, tre- e quattro-nucleotidi sono quelle più frequenti nei genomi eucariotici (Wang *et al* 1994).

Ripetizioni mononucleotidiche. Le ripetizioni mononucleotidiche sono sequenze ripetute in tandem di un singolo nucleotide. Due sono i tipi più frequenti di ripetizioni mononucleotidiche presenti nei diversi taxa: ripetizioni nucleotidiche di poli (A/T) e ripetizioni nucleotidiche di poli (C/G) (Toth, *et al.* 2000).

Ripetizioni dinucleotidiche. Si tratta di sequenze il cui motivo ripetuto è costituito da due nucleotidi. Le ripetizioni dinucleotidiche sono più abbondanti nei roditori e meno frequenti nei funghi. Esse si osservano nelle regioni intergeniche ed introniche del genoma, sono rare negli esoni. In tutti i vertebrati e artropodi AC è il motivo dinucleotidico principale, invece nelle piante, nei lieviti e nei funghi le ripetizioni AT in generale sono le più frequenti, ad eccezione degli introni dove nei funghi AC è più abbondante (Toth, *et al.* 2000).

Ripetizioni trinucleotidiche. Le ripetizioni trinucleotidiche sono formate da motivi di tre nucleotidi ripetuti n volte. Esse si trovano sia in regioni codificanti che in quelle non codificanti (Morgante *et al.* 2002). In tutti i vertebrati le ripetizioni ricche di (C + G) dominano negli esoni e sono meno presenti nelle altre regioni. AAC e AAG sono le ripetizioni più frequenti negli esoni delle piante nelle quali si rivela un'elevata abbondanza di ripetizioni (A+T), osservate anche negli esoni di lievito ed in altri funghi. Generalmente le ripetizioni trinucleotidiche ACG e ACT sono le più abbondanti in quasi tutti i taxa. Le altre ripetizioni trinucleotidiche frequenti nei primati e nei roditori sono CCG, presenti negli esoni e totalmente assenti negli introni (Toth, *et al.* 2000). Le ripetizioni trinucleotidiche come (CAG) n sono associate a malattie genetiche quali la sindrome dell'X fragile (Kremer 1991), l'ataxia di Friedreich (Campuzano, 1996), probabilmente a causa dell'instabilità dei microsatelliti durante il processo meiotico (Suzuki, 2001).

Ripetizioni tetranucleotidiche. Sono motivi formati da quattro nucleotidi che si ripetono n volte. Esse si trovano negli introni e nelle regioni intergeniche, mentre quasi tutti gli esoni sono privi di ripetizioni tetranucleotidiche. Nelle regioni introniche e intergeniche dei vertebrati, le ripetizioni tetranucleotidiche superano di molto quelle trinucleotidiche.

I motivi più frequenti delle ripetizioni tetranucleotidiche nei diversi taxa sono costituiti da (G+C), dai motivi (AAGG) che rappresentano le ripetizioni tetranucleotidiche più frequenti nei mammiferi, primati e roditori. Nei primati e nei roditori sono abbondanti anche le ripetizioni (AAAA), negli altri mammiferi troviamo inoltre ripetizioni di tipo (AAAG) e (AAAT) (Toth *et al.* 2000).

Ripetizioni pentanucleotidiche. Le ripetizioni pentanucleotidiche sono formate da motivi base di cinque nucleotidi. In tutti i taxa dei mammiferi tali ripetizioni sono le meno abbondanti nelle

regioni intergeniche ed introniche. Sono rappresentate invece negli esoni di tutti i taxa (Toth *et al.* 2000).

Ripetizioni esanucleotidiche. Le ripetizioni esanucleotidiche sono motivi di 6 nucleotidi ripetuti. Essi rappresentano il secondo tipo di microsatellite più abbondante dell'intero genoma presente negli esoni dopo le ripetizioni trinucleotidiche. Nelle regioni introniche ed intergeniche dei non vertebrati, le ripetizioni esanucleotidiche sono più abbondanti di quelle tetranucleotidiche. Negli esoni i motivi ripetuti presentano delle differenze e sono relativamente ricchi in (G+C). Nei primati, nelle piante, nei lieviti e nei funghi le regioni introniche ed intergeniche sono ricche di (A+T) (Toth *et al.* 2000).

1.3.2. Dinamica evolutiva

Quale sia l'origine dei microsatelliti, rimane ancora non del tutto chiara. Due sono i meccanismi ipotizzati per la loro genesi. Nel primo, si assume che probabilmente piccoli "proto"-microsatelliti si siano generati da cambiamenti del genoma, mutazioni puntiformi, seguite da eventi rari di slittamento della polimerasi sul filamento copia con successiva estensione di piccoli "proto"-microsatelliti (Levison & Gutman 1987a). Nel 1998 Rose e Falush proposero il "modello soglia", il quale si basa sul fatto che per avere una lunga distribuzione genomica di microsatelliti, lo slittamento sul DNA copia della polimerasi durante la replicazione poteva avvenire solo in presenza di un piccolo numero di ripetizioni. Altre ricerche nel lievito, invece, non hanno evidenziato la presenza delle ripetizioni durante lo slittamento (Pupko & Graur 1999). Il secondo meccanismo prevede invece l'associazione dei microsatelliti con gli elementi trasponibili (Nadir *et al.* 1996). Tale meccanismo ipotizza che microsatelliti ricchi in A siano generati dall'estensione in 3' di retrotrascritti, con un meccanismo simile alla poliadenilazione dell'm-RNA. Una simile associazione è stata verificata per un elevato numero di taxa, tuttavia l'alta densità degli elementi trasponibili considerati non sempre ha coinciso con l'elevata densità dei microsatelliti.

1.3.3. Meccanismi e tassi di mutazione

Nei loci microsatelliti le mutazioni generalmente consistono nel taglio di una ripetizione, anche se talvolta la mutazione coinvolge diverse unità ripetute (Weber 1990; Di Rienzo *et al.* 1995; Primmer *et al.* 1996). I tassi di mutazione degli SSR (tra 10^{-2} e 10^{-6} eventi per locus per generazione) sono estremamente elevati se paragonati con i tassi di mutazione puntiforme di loci genici codificanti. I fattori che potrebbero influenzare tale tasso di mutazione dei loci SSR sono: il numero di ripetizioni (i tassi di mutazione dei microsatelliti aumentano col numero di ripetizioni) e tipi di ripetizioni (i

tassi di mutazione dei microsatelliti diminuiscono al crescere di motivi ripetuti) (Schlotterer & Tautz 1992).

Due sono i meccanismi mutazionali ipotizzati per spiegare gli elevati tassi di mutazioni osservati nei microsatelliti. Il primo è lo “Slippage della DNA polimerasi” (Figura 1). Tale meccanismo consiste in una sorta di slittamento, lungo il filamento copia del DNA, della polimerasi durante la replicazione, con formazione di errori (Tachida & Iizuka 1992). Alcuni di questi errori sono corretti dai meccanismi di riparazione cellulare, come le correzioni delle bozze e il mismatch repair (MMR), ma molti non vengono riparati e si generano le mutazioni. Per esempio nel lievito, le ripetizioni CTG/CAG o CGG/CCG possono formare strutture secondarie che sfuggono ai meccanismi di riparazione (Moore *et al.* 1999). Quindi, l’aumento del numero di ripetizioni SSR si genera da un lato in seguito allo scivolamento sul filamento di DNA e dall’altro da un non perfetto o infallibile meccanismo di riparazione degli errori. Il secondo riguarda, invece la ricombinazione tra molecole di DNA che può potenzialmente generare un cambiamento nella lunghezza degli SSR con un crossingover ineguale. (Brohele & Ellegren 1999; Hancock 1999; Jakupciak & Wells 2000; Richard & Paques 2000; Harding *et al.* 1992) (Fig.2). Cambiamenti ineguali nella ricombinazione associati con la deriva genetica casuale e con la selezione possono creare un forte effetto sull’accumulo delle sequenze ripetute in tandem nel genoma (Charlesworth *et al.* 1994).

1.3.4. Modello di mutazione

Conoscere il meccanismo di mutazione dei microsatelliti è fondamentale in quanto molte analisi statistiche, basate sulle stime delle frequenze alleliche, dipendono dal modello di mutazione. Tradizionalmente il modello degli alleli infiniti (IAM) nel quale ogni evento di mutazione crea nuovi alleli, è stato quello scelto per l’analisi della genetica di popolazioni. Si ritiene che il meccanismo più probabile per i microsatelliti sia quello stepwise mutation (SMM) secondo il quale la mutazione cambia la lunghezza del microsatellite aggiungendo o sottraendo singole ripetizioni ad un tasso fisso che è indipendente dalla lunghezza del microsatellite (Ellegren 2004).

Tuttavia questo modello per lo studio dell’evoluzione dei microsatelliti ha dei limiti in quanto è incompatibile con il fatto che i microsatelliti hanno un limite nella dimensione (gli alleli molto lunghi sono rari). Alcune varianti del SMM affrontano questo problema introducendo un limite nella lunghezza degli alleli in modo che alleli molto lunghi mutano preferenzialmente verso alleli più piccoli e viceversa

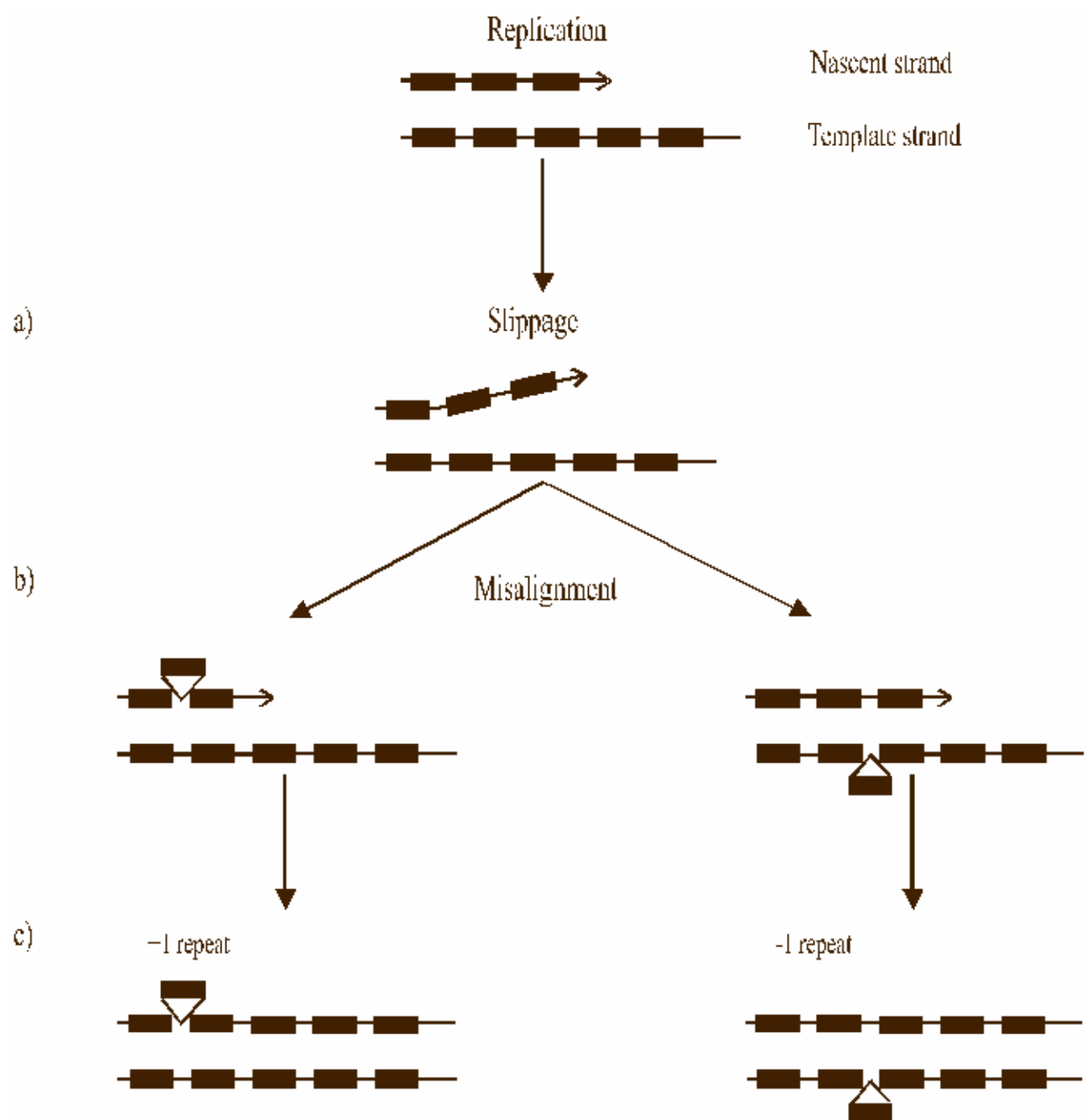


Figura 1. Probabile slittamento nel modulo di lettura durante la sintesi del nuovo filamento di DNA

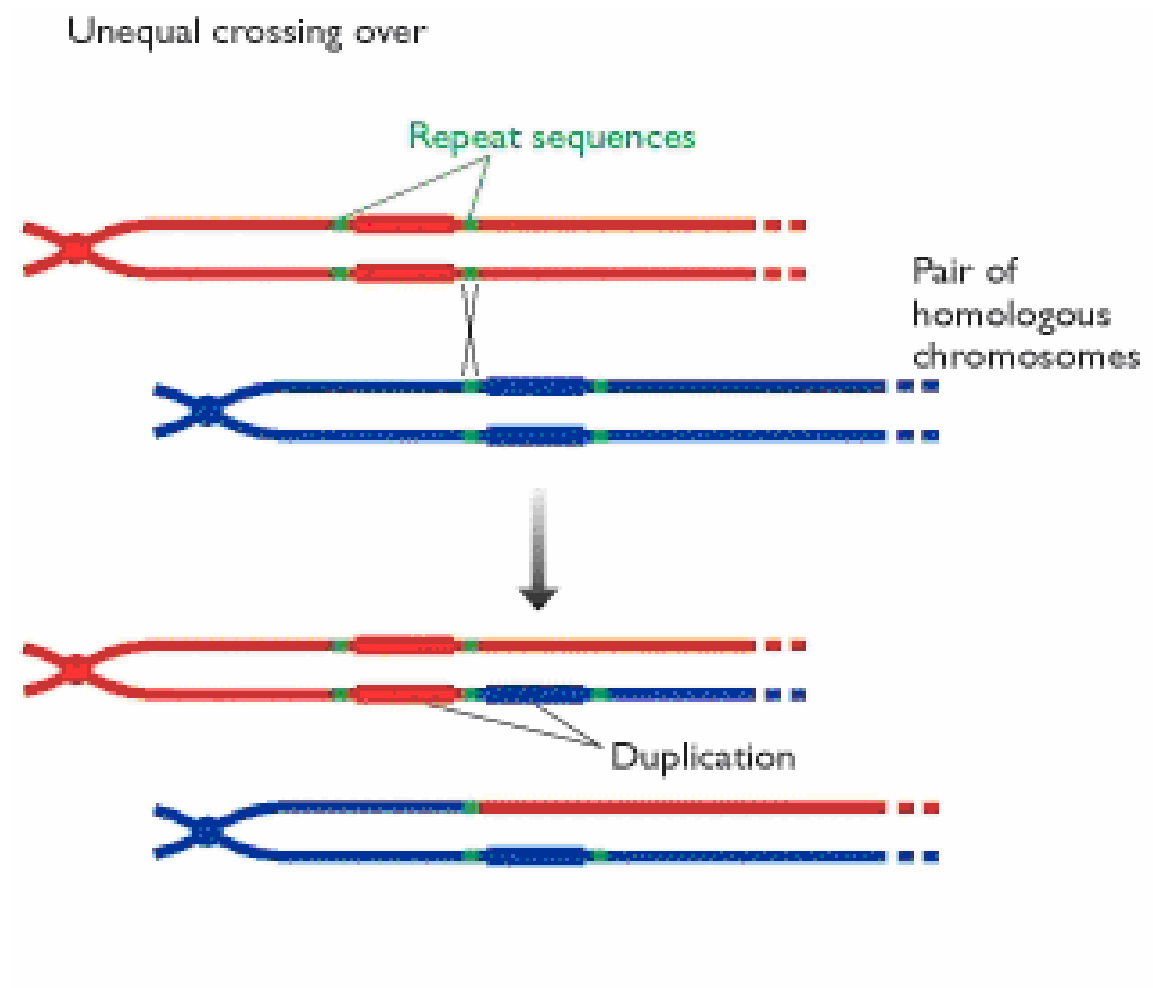


Figura 2. Modello di crossing over ineguale e origine della duplicazione di un microsatellite.

1.3.5. Vantaggi e svantaggi dei microsatelliti

I microsatelliti sono oggi comunemente utilizzati come marcatori di DNA negli studi di genetica e biologia molecolare. Sono marcatori specie-specifici, multiallelici per un determinato locus e codominanti. Hanno un elevato livello di polimorfismo, seguono un'eredità mendeliana e presentano modelli semplici di evoluzione. L'elevata variabilità e specificità li ha resi negli ultimi anni lo strumento più utilizzato in genetica di popolazione (Goldestein & Schlotterer 1999). La variabilità dei microsatelliti risiede nella lunghezza dei microsatelliti stessi, ossia nel numero di ripetizioni in tandem; differenti alleli in uno stesso locus possono così essere messi in evidenza con una semplice corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide in grado di separare frammenti che differiscono per singole coppie di basi. Poiché la maggior parte dei microsatelliti è genere-specifica o specie-specifica, la limitazione nell'uso dei microsatelliti come marcatori del DNA, risiede proprio nell'isolamento dei primer specifici.

Tuttavia anche se le conoscenze di queste semplici sequenze ripetute sono migliorate negli ultimi dieci anni, il loro contributo negli studi di genetica di popolazione è ancora oggetto di discussioni (Bruford & Wayne 1993). Infatti, i modelli e i pattern di evoluzione molecolare dei microsatelliti ed i loro meccanismi mutazionali, devono essere ulteriormente analizzati per riuscire a conoscere tutte le informazioni possibili che si possono ottenere dall'uso dei microsatelliti stessi. E' noto anche che l'uso dei marcatori microsatelliti può generare meccanismi sfavorevoli, quali l'omoplasia. Quest'ultima è una delle conseguenze dell'alta variabilità dei tassi mutazionali di alcuni marcatori molecolari, quali i microsatelliti. Per un marcatore genetico l'omoplasia si verifica quando, a causa di eventi mutazionali si hanno copie diverse di uno stesso locus di ugual lunghezza, non identiche per discendenza. L'omoplasia è implicita ai modelli mutazionali dei marcatori, tanto che è difficile pensare a due eventi evolutivi indipendenti (omoplasia e modelli mutazionali) e dipende anche dai altri fattori evolutivi indipendenti dai modelli mutazionali, come l'effettiva dimensione della popolazione e il tempo di divergenza delle popolazioni stesse. I genetisti di popolazioni hanno rivolto l'attenzione al tema omoplasia come una conseguenza della popolarità dei loci microsatelliti come marcatori genetici (Estoup *et al.* 2002). Gli alleli microsatelliti generalmente corrispondono a frammenti di DNA di lunghezza diversa evidenziabili attraverso metodi elettroforetici. Con l'utilizzo dei metodi elettroforetici però non è possibile evidenziare se due o più alleli che hanno la stessa lunghezza siano identici per discendenza. Per ovviare a questo problema bisogna sequenziare i singoli alleli con successivo allineamento (Queney *et al.* 2001).

Un altro fattore che complica l'analisi dei microsatelliti è il tasso di mutazione. I tassi di mutazione variano considerevolmente tra i diversi taxa, sono state ben osservate sostanziali variazioni tra i loci e nei loci in relazione ai tassi di mutazione (Brinkmann *et al.* 1998; Crozier *et al.* 1999; Ellegren

2000a; Gardner *et al.* 2000; Xu *et al.* 2000). Quando i microsatelliti si presentano con dimensioni alleliche diverse (Garza *et al.* 1995), il loro tasso di mutazione in un dato locus non è sempre lo stesso e non è costante nel tempo. Infatti il tasso di mutazione e la direzione della mutazione sono influenzati dalla lunghezza dell'allele (Ellegren 2000a; Xu *et al.* 2000). Le mutazioni e l'evoluzione di queste semplici sequenze ripetute derivano probabilmente da vari e continui processi dinamici (Brohede *et al.* 2002).

1.4. I microsatelliti negli studi di genetica e conservazione animale

Negli ultimi anni sono stati condotti molti studi per descrivere la struttura genetica delle popolazioni naturali e delle popolazioni di specie allevate attraverso i marcatori microsatelliti. Una delle principali applicazioni di tali studi è di conservare la biodiversità delle specie che sono minacciate da una perdita di variabilità genetica.

Tra gli esempi di ricerche eseguite su popolazioni naturali a rischio di estinzione, possiamo ricordare quelle di Zhang *et al.* (2007) sul panda *Ailuropoda melanoleuca*. I 10 microsatelliti usati nelle 5 popolazioni prese in esame hanno sorprendentemente rivelato alti valori di variabilità genetica. La differenziazione genetica tra le popolazioni è stata significativa nella maggior parte dei casi, e in particolar modo nella popolazione Qinling, a suggerire, che questa ultima dovrebbe essere una unità separata nei programmi di gestione per fini di conservazione.

Chen *et al.* (2010) hanno studiato, con dieci microsatelliti, la struttura genetica di alcune focene campionate in tre diverse regioni cinesi. Contrariamente alla bassa diversità genetica rivelata in precedenti analisi con il DNA mitocondriale, sono stati trovati livelli relativamente alti di variabilità genetica nei profili dei microsatelliti ($HE = 0,732-0,795$). L'analisi bayesiana ha suggerito inoltre che le focene potrebbero essere descritte come tre distinti gruppi genetici.

Per quanto riguarda le razze allevate la perdita di biodiversità è dovuta principalmente ai fenomeni di *inbreeding* e di deriva, che agiscono maggiormente nelle popolazioni dove la dimensione effettiva (N_e) è bassa (tipicamente nelle specie zootecniche, in cui esiste un disequilibrio tra numero di maschi e di femmine). Le specie allevate, oltre ad essere soggette ai fenomeni naturali che modificano le frequenze alleliche (principalmente deriva genetica), sono sottoposte ai processi di selezione artificiale (Bruford, 2004). La specializzazione dei nuovi sistemi produttivi e lo sfruttamento di poche razze (le cosiddette cosmopolite) con alte capacità produttive ha determinato una grave perdita di biodiversità all'interno delle specie domestiche. Per questo motivo negli ultimi

anni si sono sviluppate le ricerche per la conservazione globale delle risorse genetiche di questi animali (Taberlet *et al.* 2008).

Ad esempio Martin-Burriel e collaboratori nel 2007 hanno analizzato con trenta microsatelliti la diversità genetica tra diverse razze bovine della Spagna in pericolo di estinzione. Gli autori hanno trovato valori di diversità genetica molto bassi in particolare in una popolazione che si trova nell'isola di Maiorca. Inoltre la ridotta dimensione delle popolazioni e la deriva genetica hanno causato una divergenza genetica tra le diverse razze.

Uno studio di Cymbron e collaboratori del 2005 condotto su venti popolazioni di bovini Europei e nove del Vicino Oriente, ha esaminato i livelli di diversità genetica e le relazioni esistenti tra le diverse razze con l'uso di diciannove microsatelliti. I risultati hanno evidenziato un forte declino della variabilità genetica dall'Oriente verso l'Europa, confermando l'origine dei bovini domestici dal vicino oriente. Inoltre i dati hanno dimostrato una differenza genetica tra le razze Nord Europee e quelle delle regioni Mediterranee in accordo con il movimento del bestiame lungo due percorsi distinti durante il processo di domesticazione. In uno studio simile (Medugorac *et al.* 2009) sono stati analizzati 105 loci microsatelliti in sedici razze di bovini appartenenti a diverse aree geografiche quali l'Anatolia, i Balcani, le regioni alpine e dell'Europa settentrionale. I dati hanno dimostrato l'elevata variabilità genetica delle razze provenienti dall'Anatolia, che sono vicine al centro di domesticazione, rispetto a quelle del Nord Europa.

Lawson Handley e collaboratori (2007) hanno eseguito la prima indagine in ovini europei analizzando con 23 microsatelliti 820 animali appartenenti a 29 razze geograficamente e fenotipicamente diverse. A differenza di molte altre specie domestiche, è stato trovato un diffuso deficit di eterozigoti all'interno delle razze. Questo è stato spiegato con la suddivisione delle popolazioni (effetto Wahlund) e l'uso di un piccolo numero di arieti per la riproduzione. I livelli di eterozigosi erano leggermente più alti nelle razze del sud rispetto a quelle del nord, coerentemente con la declino della diversità genetica man mano che ci si allontana dal centro di domesticazione.

Ancora, Pariset e collaboratori nel 2003 hanno dimostrato l'utilità dei microsatelliti per studiare la variabilità genetica in 17 greggi di razza ovina sarda nella provincia di Viterbo. I dati ottenuti dagli 11 microsatelliti testati sono stati utilizzati per stimare la variabilità genetica presente all'interno e tra le greggi, e i valori di inbreeding.

2. Finalità della ricerca

I microsatelliti sono tra i marcatori più utilizzati per gli studi di genetica di popolazioni. Inoltre poiché questi marcatori sono in genere abbastanza corti (circa 100-300bp), possono essere amplificati tramite PCR anche quando il DNA di partenza è degradato (Taberlet *et al.* 1999). La rottura del DNA in tanti frammenti che si riscontra nel DNA degradato, infatti, rende difficile l'amplificazione di segmenti lunghi e il successo di amplificazione è proporzionale alla lunghezza del frammento da amplificare (Frantzen *et al.* 1998). Per questo i microsatelliti sono utilizzati anche negli studi del DNA antico che è noto, essere altamente degradato.

Lo scopo di questo lavoro è di applicare i marcatori microsatelliti a due diversi studi. Il primo riguarda l'analisi della struttura genetica di sei popolazioni di bufali provenienti dalla Turchia (Anatolian water buffalo). Questo rappresenta il primo studio effettuato in tali popolazioni che necessitano particolare attenzione a causa 1) della vicinanza della Turchia al centro di domesticazione e di probabile diffusione della specie verso l'Italia; 2) della drastica diminuzione del numero degli individui che si è verificato negli ultimi decenni. In Turchia i bufali hanno una grande importanza economica poiché sono usati per la produzione di latte e di carne ma anche come animali da lavoro. Nei piccoli villaggi gli allevatori possiedono pochi animali che vengono utilizzati per il consumo familiare, le grandi aziende invece si trovano solo nelle grandi città. Nonostante il numero degli individui sia diminuito da 1,117,000 a 110,000 capi negli ultimi trenta anni, l'allevamento di questa specie è sopravvissuta al fine di promuovere sistemi produttivi, in accordo con uno sviluppo rurale sostenibile. In questo contesto si inserisce la presente ricerca che ha come primo obiettivo quello di analizzare la struttura genetica e le relazioni tra diverse popolazioni di bufali appartenenti a sei regioni della Turchia che rappresentano i più importanti siti di allevamento. A tal fine sono stati selezionati dal database BOVMAP e dalla lista FAO un pannello di 21 microsatelliti sviluppati nel bovino per analizzare 154 campioni. Sono stati calcolati gli indici di diversità genetica e il grado di differenziamento tra le diverse popolazioni. I risultati ottenuti potranno essere utili ai fini della conservazione dei bufali dell'Anatolia che rappresentano una grande risorsa economica per il Paese.

L'altro studio ha come obiettivo quello di identificare dei loci microsatelliti da potere utilizzare nello studio del DNA antico e in particolare in resti di animali domestici. L'analisi del DNA antico può essere un ottimo strumento per interpretare la struttura genetica di popolazioni di animali allevati in tempi storici, la loro origine geografica, la demografia. Inoltre lo studio dei genotipi ci permette di attribuire i resti di animali prelevati negli stessi siti di ritrovamento a specifici individui,

di stabilire l'appartenenza alle popolazioni e di confrontarle con le popolazioni moderne. Tuttavia i marcatori microsatelliti, pur essendo molto informativi e variabili, sono difficili da analizzare in quanto si trovano nel DNA nucleare che, in campioni antichi, è scarso e molto degradato. Inoltre le possibilità di contaminazioni con DNA esogeno quando si lavora con materiale antico è estremamente elevato, per cui si devono adottare molte precauzioni e utilizzare dei laboratori appositi.

In questo studio abbiamo selezionato dal database FAO un set di 15 microsatelliti per i quali sono stati ridisegnati, sulle sequenze di riferimento, primers specifici capaci di amplificare frammenti più corti di quelli originali. I loci sono stati analizzati su resti di ossa di bovini risalenti al medioevo prelevati da Ferento, un sito archeologico situato nell'Italia centrale. I dati ottenuti sui campioni antichi sono stati poi confrontati con quelli provenienti da 72 razze moderne.

3. Analisi di microsatelliti in diverse popolazioni di bufali provenienti dalla Turchia

3.1. Caratteristiche e distribuzione dei bufali della Turchia (Anatolian buffalo)

Il bufalo *Bubalus bubalis* è tra gli animali domestici più produttivi. Riconosciuti per centinaia di anni come efficienti animali da lavoro, oggi vengono allevati principalmente per la produzione di carne e latte. Nonostante rappresenti una grande risorsa economica, il bufalo è stato poco studiato se paragonato alle altre specie di ruminanti domestici (*Bos taurus* e *Bos indicus*). Solo negli ultimi anni si è assistito ad un notevole risveglio di interesse per gli aspetti tecnico-scientifici dell'allevamento bufalino in tutti i Paesi a zootecnia più o meno progredita.

Le razze bufaline producono latte caratterizzato da maggior contenuto in grassi, in media l'8%, rispetto a quello di vacca. In paesi come l'India, il Pakistan e la Turchia questi animali costituiscono una fonte di sostentamento umano fondamentale; il 70% del latte consumato in questi paesi proviene proprio dalle bufale. Anche l'uso della carne come fonte alimentare si sta sviluppando sempre di più negli ultimi anni. La carne di bufalo, infatti, oltre ad essere appetitosa e tenera ha un ridotto contenuto di grassi se paragonata alla carne bovina.

All'interno della specie *Bubalus bubalis* si distinguono due grandi gruppi, morfologicamente assai diversi. Il primo è il bufalo "swamp" (Figura 3), che significa "bufalo di palude", dalle corna laterali e in posizione orizzontale, che si curvano quando l'animale invecchia, più basso di statura (circa 130 cm l'altezza al garrese, da 325 a 450 kg il peso del maschio adulto), allevato principalmente per il lavoro nelle risaie e come animale da tiro. Viene munto, ma la ridotta quantità di latte che produce (al massimo è 600-700 kg in una lattazione di 200 giorni) viene consumata in famiglia. Si trova principalmente in Cina, Thailandia, Filippine, Vietnam, Malesia, Indonesia, Cambogia, Laos (Cockrill 1981). Il secondo è il "river buffalo" (Figura 4), che significa bufalo di fiume, dalle corna in direzione posteriore che successivamente si curvano a spirale verso l'alto, di corporatura e altezza superiori al primo (da 133 a 142 cm l'altezza al garrese e peso da 450 a 800 kg del maschio adulto), che produce elevate quantità di latte (oltre 1.500 kg in una lattazione). E' allevato in India, Pakistan, Nepal, Bhutan, Myanmar (ex Birmania), Sri Lanka, nel Vicino Oriente, in Egitto e in Europa, soprattutto in Italia. Del "river buffalo" sono state classificate 18 razze, le principali delle quali sono la Murrah (India) e la Nili Ravi (Pakistan), da lungo selezionate per la produzione di latte (Cockrill 1981).



Figura 3. Swamp buffalo



Figura 4. River buffalo

Gli studi di genetica molecolare sulle origini del bufalo domestico hanno indicato una netta separazione degli aplotipi generati dall'analisi del DNA mitocondriale (mtDNA) (Zhang *et al.* 2007). I tempi di divergenza tra il “river type” e “swamp type” variano da 10 000-1.700.000 di anni fa, e datano l'evento di domesticazione a 3000-6000 di anni fa (Cockrill 1981; Kumar *et al.* 2007a; Yang *et al.* 2008). Pertanto, si suppone che il bufalo “river type” e quello “swamp type” siano stati domesticati separatamente, molto probabilmente nella valle dell'Indo e Cina rispettivamente (Lau *et al.* 1998; Kumar *et al.* 2007b; Lei *et al.* 2007).

In Turchia esiste solo una razza chiamata “Anatolian water buffalo” che significa bufalo dell'Anatolia, classificata come razza Mediterranea appartenente al river type. Morfologicamente i bufali dell'Anatolia presentano una colorazione molto scura del mantello, corna lunghe e strette,

corpo allungato. Le orecchie sono larghe e a volte si osservano macchie bianche sulla testa e sulle zampe (Figura 5).



Figura 5. Esemplare di un bufalo dell’Anatolia (Anatolian water buffalo)

L’areale di distribuzione è rappresentato principalmente dalle regioni del Nord Ovest, e da quelle che si affacciano sul Mar Nero e da quelle dell’Est Anatolia (Soysal *et al.* 2005). Per quanto riguarda i sistemi di allevamento ci sono differenze tra le diverse regioni. Nei piccoli villaggi gli allevatori possiedono pochi capi di bestiame (2-3) che utilizzano principalmente come risorsa di latte e carne per il consumo familiare (Soysal *et al.* 2007) Durante i mesi primaverili ed estivi, quando il pascolo è abbondante, gli animali provenienti da diversi villaggi, sono portati insieme al pascolo. In inverno invece, gli animali sono tenuti principalmente nelle stalle che si trovano al piano terra delle abitazioni. Le aziende più grandi, formate da circa 100 capi, si trovano esclusivamente nei pressi delle grandi città.

In tempi passati i bufali dell’Anatolia venivano usati principalmente come animali da lavoro, oggi invece vengono allevati per la produzione di latte e carne. Alcuni prodotti tipici, come il dessert “baklava” e salsicce, vengono prodotti esclusivamente con latte e carne di bufala.

Durante il periodo di lattazione, che dura circa 300 giorni, la quantità di latte giornaliera prodotta non supera gli otto litri, mentre quella annuale è di circa 1000 litri. Per quanto riguarda la

composizione del latte, la percentuale di grasso è stimata intorno al 6-8%, quella delle proteine intorno al 4%. In tabella 1 sono riassunte alcune delle caratteristiche citate.

Nonostante i bufali dell'Anatolia abbiano un ruolo fondamentale per l'economia del paese, negli ultimi anni si è assistito ad una drastica diminuzione del numero di individui. La ragione va ricercata nella diffusione delle razze bovine che hanno una produzione di latte e carne maggiore.

Secondo le statistiche della FAO del 2003 ([http:// faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/)) dal 1984 al 1997, la popolazione dei bufali della Turchia ha subito una riduzione nel numero di individui del 65%; ad oggi ci sono circa 164.000 capi.

Nasce quindi l'esigenza di progettare strategie per la conservazione della variabilità genetica di questa specie. A tal fine è fondamentale conoscere la struttura genetica e le relazioni esistenti tra le diverse popolazioni che oggi esistono in Turchia. L'obiettivo di questo lavoro è stato proprio quello di analizzare, con 21 microsatelliti, la diversità genetica dei bufali dell'Anatolia appartenenti a sei regioni della Turchia che rappresentano i più importanti siti di allevamento.

Tabella1. Caratteristiche zootecniche dei bufali dell'Anatolia

(Soysal *et al.* 2007)

	Massimo	Minimo
Quantità latte giornaliera (kg)	1070.5±279.9	709.6±23.0
Durata lattazione (giorni)	269.2±70.0	222.0±44.2
% Grasso del latte	8.1±0.205	6.6±0.68
%Proteine del latte	4.06	4.02
Durata gestazione (giorni)	326.5±5.8	317.0±51.5

3.2. Materiali e metodi

3.2.1. Campionamento ed estrazione del DNA

Gli individui di *Bubalus bubalis* analizzati in questo studio provengono da sei siti geografici di campionamento che corrispondono a quattro regioni della Turchia (Figura 6). Gli individui campionati sono stati in totale 149, di cui 32 nel distretto di Pazar, 17 nel distretto di Danamandira , 34 nel distretto di Merzifon, 19 nel distretto di Thural, 29 nel distretto di Coskun, 18 nella provincia di Afyon.

Pazar e Turhal sono due distretti della provincia di Tokat nell'Anatolia cento-orientale, Merzifon è un distretto della provincia di Samsun collocata nella regione del Mar Morto, Afyon è una provincia che si trova nell'Anatolia centrale. Danamandira e Coskun si trovano nel distretto di Silivri che appartiene alla provincia di Istanbul. I siti di campionamento corrispondono alle regioni in cui si trovano la maggior parte degli allevamenti

I campioni di sangue sono stati raccolti in falcon da 10ml contenenti K₂EDTA e conservati a -20 °C fino al momento dell'estrazione del DNA.

Per l'estrazione del DNA si è utilizzato il kit Wizard DNA genomic (Promega). Il protocollo di estrazione è il seguente:

1. Aliquotare 300 µl di sangue in un tubo eppendorf da 1.5 ml e aggiungere 900 µl di cell lysis solution. Mescolare per inversione (5/6 volte). Lasciare 10 minuti a temperatura ambiente invertendo ogni tanto.
2. Centrifugare 1 minuto a 14000 rpm. Scartare il sovrnatante e vortexare il pellet
3. Aggiungere 300 µl di Nuclei Lysis Solution, pipettare per risospendere il pellet
4. Unire 100 µl di Protein Precipitation Solution vortexando vigorosamente per 20 secondi
5. Centrifugare per 4 minuti a 14000 rpm
6. Trasferire il supernatante con il DNA in un nuovo tubo da 1.5 ml contenente 300 µl di isopropanolo a 4°C, mescolare per inversione
7. Centrifugare a 14000 rpm per 3 minuti. Scartare il sovrnatante e aggiungere 300 µl di etanolo al 70% per lavare il pellet.

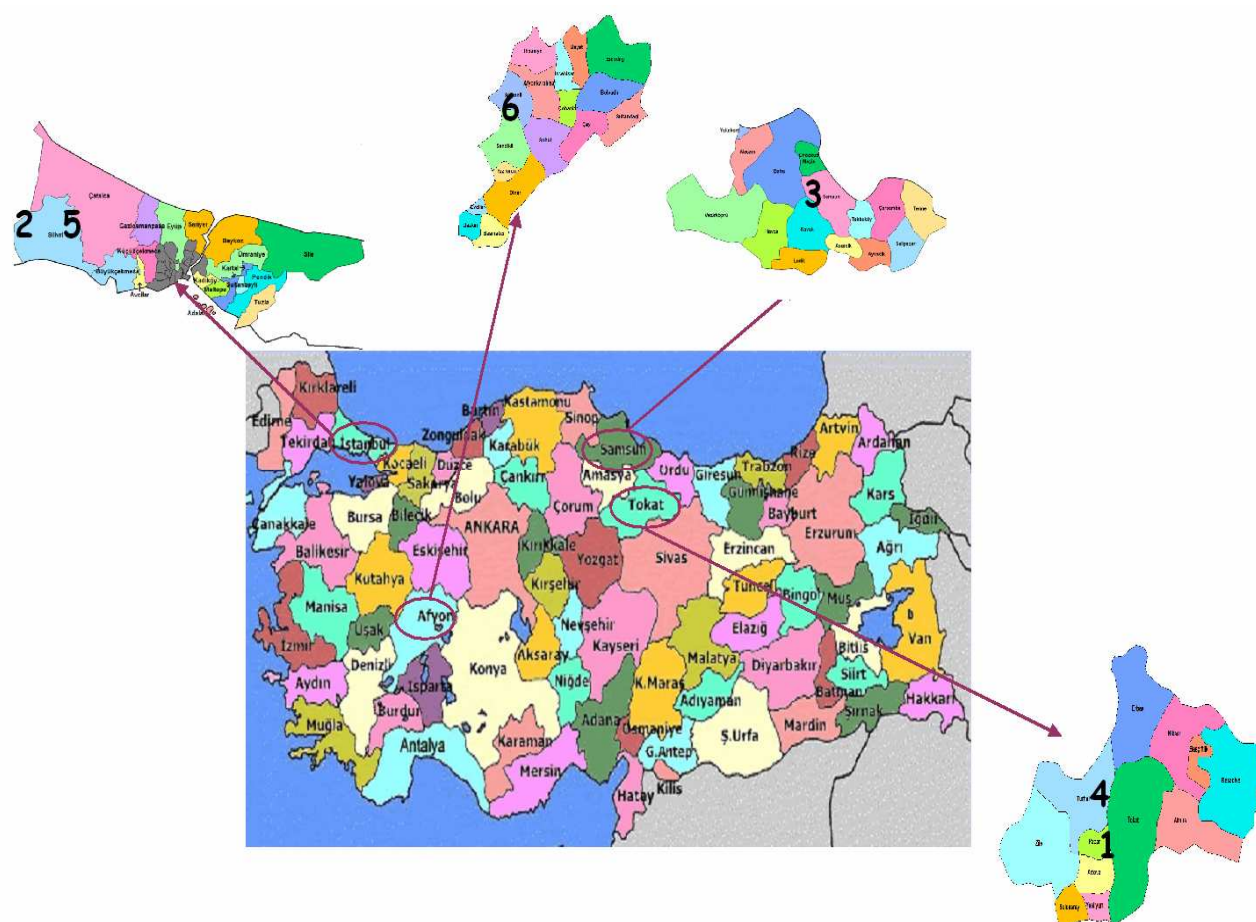


Figura 6. Siti di campionamento delle sei popolazioni dei bufali dell'Anatolia. I numeri corrispondono ai seguenti siti di campionamento: 1, Pazar, 2, Danamandira, 3, Merzifon, 4, Turhal, 5, Coskun, 6 Afyon

8. Centrifugare a 14000 rpm per 3 minuti e scartare il sovrantante. Asciugare a temperatura ambiente.
9. Reidratare il pellet di DNA con 50 l di TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM pH 8).
10. I campioni vengono conservati a 4°C.

La valutazione della qualità del DNA estratto è stata eseguita sottoponendo i campioni ad elettroforesi su gel di agarosio all' 1% nel quale viene aggiunto Bromuro di Etidio, che ha la capacità di intercalarsi nella molecola di DNA e di renderla fluorescente se illuminata con UV (320 nm). La preparazione dell'agarosio e la corsa elettroforetica sono state effettuate in tampone TAE 1X (0.8 M Tris-acetato e 0.02 M EDTA). La quantificazione del DNA si è eseguita con il Picogreen (Invitrogen) utilizzando il DTX Multimode Detector Beckman.

3.2.2. Scelta e genotipizzazione dei microsatelliti

La tecnica dei microsatelliti prevede due steps: l'amplificazione dei loci tramite PCR usando primers fiancheggiati le sequenze ripetute e la visualizzazione dei prodotti dopo corsa elettroferetica. Poiché il polimorfismo dei microsatelliti risiede proprio nella lunghezza, essi possono essere separati con un'elettroforesi ad alta risoluzione, che permette un rapido genotipaggio degli individui. In questo lavoro sono stati utilizzati 26 loci microsatelliti, di cui 11 selezionati dal database BOVMAP e 15 dalla lista FAO per la specie bovina. I marcatori sono stati scelti in modo da essere equamente distribuiti nel genoma bovino. La tabella 2 riporta i 21 loci amplificati con successo.

La reazione di amplificazione avviene utilizzando primers marcati all'estremità 5' con uno dei tre diversi fluorofori riconosciuti dal sequenziatore CEQ 8800 Beckman. In tabella 3 sono riportati le proprietà spettrali dei fluorofori. La PCR è stata condotta in un volume finale di 20 ul contenente 2µl di DNA stampo diluito 1:10 corrispondenti a 20ng di DNA e 18µl di miscela di reazione costituita da: 1x buffer, 2.5 mM MgCl₂, 200 uM dNTPs, 0.05uM di primer (Proligo), 0.2 unità di Taq Polimerasi (Bio-x-act short Bioline).

Tabella 2. Lista dei microsatelliti analizzati

Locus	BTA	Grandezze alleliche	Ann.temp.
BM1824 [*]	1	170-202	57
ETH10 [*]	5	120-226	63
ETH152 [*]	5	196-218	63
INRA005 [*]	12	140-158	53
SPS115 [*]	15	248-268	59
TGLA126 [*]	20	102-128	53
TGLA227 [*]	18	77-109	56
TGLA53 [*]	16	132-176	55
BMS1226 [†]	13	130-170	58
CA004 [†]	15	116-164	55
BM1818 [*]	23	191-283	56
BMS1747 [†]	14	85-101	57
BMS1352 [†]	13	89-105	61
ILSTS058 [†]	17	126-152	58
HEL13 [*]	11	172-192	52
BMS462 [†]	16	111-141	59
BL1036 [†]	14	172-198	55
BM1316 [†]	12	96-128	54
CSSM047 [†]	8	128-166	55
BMS4016 [†]	1	125-151	58
TGLA159 [†]	4	213-261	57

BTA, cromosoma bovino;† Microsatelliti selezionati dal database BOVMAP; * Microsatelliti

selezionati dalla lista FAO; valori di PIC (polymorphic information content) per ciascun marcatore

Tabella 3. Caratteristiche dei tre fluorofori usati per la marcatura dei primers

WellRED oligo	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)	Molar extinction coefficient
D2-PA	750	770	170,000
D3-PA	685	706	224,000
D4-PA	650	670	203,000

La reazione di amplificazione consiste nel seguente programma PCR:

- | | |
|-----------------------------|------------|
| 1. 95°C per 5 minuti | |
| 2. 95°C per 30 secondi | |
| 3. Annealing per 30 secondi | |
| 4. 72°C per 1 minuto | } 30 cicli |
| 5. 72°C per 5 minuti | |
| 6. 4°C | |

La reazione di amplificazione selettiva avviene utilizzando un programma di PCR *touch down*, partendo da una temperatura di appaiamento di 7°C superiore alla temperatura di denaturazione dei primer. Nei passaggi successivi questa temperatura viene progressivamente ridotta fino a portare la temperatura di *annealing* a quella specifica per il completamento della reazione. La PCR *touch down* favorisce l'amplificazione di sequenze perfettamente complementari agli inneschi utilizzati rispetto a frammenti non specifici.

3.2.3. Elettroforesi capillare

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante la tecnica dell'elettroforesi capillare su gel di separazione. Questi gel hanno un alto potere risolutivo in quanto consentono di separare frammenti che differiscono l'uno dall'altro, anche di un solo nucleotide.

Il principio è lo stesso dell'elettroforesi "classica": i frammenti di DNA migrano attraverso il gel all'interno di un capillare che li separa in base alle dimensioni (peso molecolare/lunghezza);

frammenti più piccoli migrano attraverso le maglie del gel più velocemente, escono prima dal capillare e vengono intercettati per primi dal sistema di rivelazione.

Tale dispositivo emette un raggio luminoso che colpisce i frammenti di DNA che, se marcati con molecole fluorescenti, a loro volta emettono un segnale in uscita che viene registrato. Il risultato è un elettroferogramma. Lo strumento da noi usato per l'elettroforesi capillare è il sequenziatore CEQ 8800 Beckman (Figura 7)



Figura 7. Sequenziatore CEQ 8800 Beckman

Il campione da caricare viene preparato nelle apposite piastre fornite dalla Beckman in un volume totale di 40ul contenente

38.7ul SLS

0.3ul standard400 (CEQ 400)

1ul prodotto di PCR

Lo standard di peso molecolare noto, è formato da un insieme di frammenti di dimensione conosciuta (compresa tra 50 e 500bp) marcati con un fluoroforo diverso da quello utilizzato per marcare i primers. Per ogni campione è stato possibile separare i frammenti amplificati per colore del fluoroforo e dimensionare gli alleli di ogni *locus* microsatellite. Il dimensionamento dei singoli alleli avviene per confronto con lo *standard* interno.

L'analisi dei frammenti è stata eseguita attraverso la **binning analysis** che ha permesso di esaminare i profili dei microsatelliti per ogni marcatore con fluoroforo;

Per “binning” o formazione di bin s’intende il raggruppamento monodimensionale, in base alle dimensioni, di frammenti compilati da campioni multipli. L’analisi dei bin ottenuti permette di generare un elenco di alleli rappresentativo della popolazione oggetto dello studio. Quando vengono condotte analisi dei bin, il sistema raggruppa i frammenti in base alle loro dimensioni, in modo da formare “bin” caratterizzati da dimensioni medie e da una deviazione standard dei frammenti compresi nel bin. L’analisi di ogni picco allelico e il suo dimensionamento in paia di basi hanno permesso di ricavare il genotipo per ogni individuo.

3.2.4. Analisi statistiche

I dati ottenuti dall’analisi elettroforetica dei campioni sono stati utilizzati per calcolare le stime di variabilità genetica, le deviazioni dall’equilibrio di Hardy-Weinberg, la variabilità genetica all’interno delle popolazioni e tra le popolazioni e la strutturazione delle popolazioni. E’ stato inoltre valutato lo stato di equilibrio mutazione-deriva delle popolazioni. Per le elaborazioni sono stati utilizzati i programmi: GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset, 1995), GENETIX (Belkhir *et al.* 2004), BOTTLENECK (Piry *et al.*, 1999), GENALEX (Peakall & Smouse 2006), POWERMARKER (Liu & Muse 2005) STRUCURE (Pritchard *et al.* 2000).

3.2.4.1. Stime di variabilità genetica

Sono stati utilizzati i seguenti parametri di variabilità genetica:

- 1) L’eterozigosi attesa (Hetexp) in una popolazione, dove avvengono accoppiamenti casuali, è stata calcolata attraverso il software POWERMARKER. Se ci sono i differenti alleli e p_i è la frequenza dell’allele i -esimo allora

$$H_s = 2 \sum_{i,j} p_i p_j = 1 - \sum_i p_i^2$$

- 2) I valori di PIC (Polymorphic Information Content) che si riferiscono alla capacità del marcatore di rivelare il polimorfismo e dipende dal numero di alleli e dalla distribuzione della loro frequenza sono, stati calcolati con POWERMARKER;

- 3) Proporzione di loci polimorfici (P), data da: $P = N \text{ loci polimorfici} / N \text{ tot. di loci}$. Sono stati utilizzati due criteri di polimorfismo, che considerano Un locus è stato considerato polimorfico se la frequenza dell'allele più comune è $< 0,95$ (P95);
- 4) Numero medio di alleli per locus (A) $A = N \text{ totale di alleli} / N \text{ totale di loci}$. Questo parametro dipende molto più degli altri dalle dimensioni del campione, poiché generalmente nelle popolazioni naturali vi sono molti alleli a bassa frequenza (tra 0,1 e 0,5), che possono non essere osservati in campioni piccoli.

3.2.4.2. Equilibrio di Hardy-Weinberg

Per rilevare possibili deviazioni dall'equilibrio di HW dovute ad un eccesso o deficit di eterozigoti è stato usato il programma GENEPOP. Quest'ultimo usa come parametro l'indice *Fis* per descrivere il deficit di eterozigoti dovuto ad accoppiamenti non casuali tra individui in una sottopopolazione. La significatività è stata testata tramite catene di Markov, usando 1000 permutazioni e 1000 *batch* per permutazione e riportando la percentuale di valori maggiori rispetto a quelli osservati.

3.2.4.3. Il linkage disequilibrium,

Il linkage disequilibrium, ovvero l'associazione non casuale tra gli alleli di un locus e gli alleli di un altro locus, è stato testato con GENEPOP. L'ipotesi zero è che i genotipi di un locus siano indipendenti dai genotipi di un altro locus. In particolare, Genepop crea delle tabelle di contingenza per tutte le coppie di loci in ogni popolazione, e ad ogni coppia è associato il valore di probabilità (corretto secondo il test di Fisher) di ottenere per caso un valore di linkage come quello relativo al dataset originale. Il livello di significatività globale del test è $\alpha = 0,05$, e consiste nella probabilità massima di errore che si è disposti ad accettare nel respingere l'ipotesi H_0 .

3.2.4.4. Statistiche F di Wright

Gli F-statistici rappresentano un set di strumenti individuati da Wright (1951) per ripartire il deficit di eterozigosi all'interno degli individui appartenenti alla stessa popolazione e tra individui appartenenti a diverse popolazioni. Essi sono largamente usati dai biologi di popolazione nell'assegnare i livelli strutturali in campioni di popolazioni naturali. L'*Fis* misura il deficit di eterozigosi all'interno di ogni popolazione, l'*Fst* misura il deficit di eterozigosi tra le popolazioni (una misura dell'effetto Wahlund), mentre l'*Fit* misura il deficit globale di eterozigosi.

Nel calcolo dei parametri *Fis*, *Fst* e *Fit* è stato utilizzato il metodo descritto da Weir & Cockerham (1984) che prende in considerazione la dimensione e il numero dei campioni attraverso il software GENETIX. I valori delle statistiche F riportati sono stati ottenuti con la procedura del Jackknifing. Essa è una procedura numerica che consiste nell'omettere, a turno, ciascuna unità (campioni o loci) e quindi ricalcolare da questo set di dati ridotti diversi F-statistici. La stima fornita dallo Jackknifing è la media aritmetica di tali valori ricalcolati. La differenziazione delle popolazioni è stata calcolata utilizzando anche un altro coefficiente che è l'indice *Gst unbiased* Nei (1973).

Nei (1973) propose un approccio alternativo all'*Fst* di Wright per determinare la differenziazione delle popolazioni, che si basa sulle frequenze alleliche da cui si deriva l'eterozigosi attesa entro e tra popolazioni.

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

Dove D_{ST} è la media delle diversità geniche tra sottopopolazioni e H_T è la diversità genica nella popolazione totale

Inoltre si è proceduto a calcolare le matrici dell' *Fst* a coppie, al fine di misurare il grado di differenziamento tra coppie di popolazioni

3.2.4.5. Amova

L'Analisi della Varianza Molecolare 'AMOVA', è stata calcolata per mezzo del software GENEALLEX. L'AMOVA verifica quanta della varianza totale delle frequenze alleliche calcolate è spiegata dalle differenze tra gruppi di popolazioni e quanta dalle differenze tra individui entro i gruppi.

3.2.4.6. Equilibrio mutazione deriva (Bottleneck)

Una riduzione della grandezza effettiva di una popolazione, evento definito "collo di bottiglia", ha come conseguenza nella popolazione una corrispondente perdita di diversità genetica. Tale perdita riguarda la diminuzione del numero di alleli e del conseguente livello di eterozigosi ai loci polimorfici. Generalmente, all'inizio dell'evento "collo di bottiglia" si osserva un eccesso di eterozigoti ai loci non soggetti a selezione. L'eterozigosi, cioè, calcolata su un campione di geni dovrebbe risultare più alta di quella attesa in relazione al numero di alleli trovati nel campione, che indicherebbe, appunto, una popolazione non all'equilibrio mutazione-deriva. Nella popolazione che abbia subito un collo di bottiglia, l'eccesso di eterozigoti è una conseguenza del fatto che il numero

di alleli, soprattutto quelli rari, diminuisce più rapidamente del tasso di eterozigosi. Gli alleli rari, infatti, non solo sono persi rapidamente ma hanno anche uno scarso effetto sull'eterozigosi. Quindi, molti alleli possono essere persi senza una rilevante riduzione di eterozigosi. L'eccesso di eterozigoti si mantiene, tuttavia, solo per un certo numero di generazioni fino a quando non si sia stabilito un nuovo equilibrio mutazione-deriva. Un deficit di eterozigoti, rispetto all'equilibrio mutazione-deriva, indica, invece, una recente espansione della popolazione (Luikart & Cornuet, 1998). Per valutare se la differenza tra l'eterozigosità osservata e attesa, in base all'equilibrio mutazione-deriva, sia significativamente diversa da zero, è stato utilizzato il "Wilcoxon's signed rank test". Tale test si basa sull'assunzione che i loci mutino secondo il modello step wise. Le elaborazioni per il "Wilcoxon's test" sono state eseguite utilizzando il programma BOTTLENECK (Piry *et al.* 1999).

3.2.4.7. Analisi delle componenti principali (PCA)

L'analisi delle componenti principali o PCA, è una tecnica della statistica multivariata utilizzata per la semplificazione dei dati. Con questa tecnica si possono ridurre il numero delle variabili mantenendo la massima quantità di informazione. Con il programma GENALEX vengono costruite combinazioni lineari delle variabili originali, nello specifico le distanze genetiche. Le variabili trasformate sono proiettate in un sistema cartesiano nel quale la variabile con la maggiore varianza viene proiettata sul primo asse, la variabile con maggior varianza, esclusa la prima, sul secondo asse.

3.2.4.8. Analisi Bayesiana (Structure)

Il metodo Bayesiano utilizzato è quello implementato nel software STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000; <http://pritch.bsd.uchicago.edu>). Brevemente, l'algoritmo definisce il numero di popolazioni di riferimento, ciascuna caratterizzata da un insieme di frequenze alleliche e poi assegna ogni individuo in maniera probabilistica. Il risultato che si ottiene è la probabilità a posteriori che un individuo "i" appartenga alla popolazione Z (sconosciuta) dato il genotipo X e stimate le frequenze alleliche P di tutte le popolazioni ($\Pr(X|Z, P)$). La probabilità a priori, cioè la probabilità che un individuo appartenga a una qualsiasi delle k popolazioni di riferimento, è definita come $1/k$.

3.3. Risultati

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di analizzare la variabilità e la diversità genetica esistente in sei diverse popolazioni di bufali provenienti dalla Turchia.

3.3.1. Indici di diversità genetica

Dei 25 microsatelliti testati soltanto 4 non hanno dato amplificazioni positive e per questo sono stati eliminati dalle analisi. I restanti 21 loci hanno amplificato con successo nei campioni bufalini e hanno dato una buona riproducibilità. L'alto numero di loci amplificati con successo conferma la vicinanza genetica delle due specie. Inoltre i loci sono risultati tutti polimorfici.

In totale sono stati identificati 254 alleli con un numero medio di alleli per locus pari a 12.57, valore un po' inferiore rispetto a quello osservato (14.36) nello studio della diversità genetica di 30 razze bovine Europee (European Cattle Genetic Diversity Consortium 2006). Nella Tabella 4, per ciascuno dei marcatori, vengono riportati il numero di alleli, la frequenza dell'allele più rappresentato nel campione totale (insieme di popolazioni) e i valori del PIC (Polymorphic Information Content). Il numero di alleli varia da 7 per il locus TGLA126 a 17 per il locus BL1036.

Gli istogrammi in Figura 8 rappresentano le frequenze alleliche per locus per popolazione. La rappresentazione grafica evidenzia meglio il diverso grado di polimorfismo dei loci. Si nota che i loci BL1036 e CA004 sono i più polimorfici come evidenziato dal basso valore di frequenza media dell'allele più rappresentato. Al contrario BL1036 ed ETH10 che mostrano un alto valore di frequenza media dell'allele più rappresentato, sono i loci meno polimorfici.

Il valore di PIC è stato calcolato per ciascun marcatore e varia da 0.24 (ETH10) a 0.86 (BMS1747). Soltanto i loci ETH10 e TGLA126 mostrano valori di PIC inferiori a 0.50. Secondo Botstein *et al.* 1980 loci con valori di PIC >0.5 sono molto informativi. L'alto valore del PIC medio osservato, pari a 0.70, per i 21 microsatelliti, indica l'idoneità del set di marcatori utilizzati per l'analisi della diversità genetica nelle popolazioni dei bufali dell'Anatolia. Questi dati dimostrano che questi microsatelliti potrebbero anche essere usati nel bufalo per implementare sistemi di diagnosi di parentela e di tracciabilità dei prodotti.

I valori di eterozigosi osservata e attesa, il numero medio di alleli e i valori del F_{is} per ciascuna popolazione sono riportati in tabella 5. Si nota che i valori di eterozigosi osservata variano da 0.5 per Afyon a 0.58 per Merzifon e Thural, quelli attesi da 0.62 per Pazar e Danamandira e 0.81 per

Merzifon. Il numero medio di alleli per popolazione varia da 5.14 per Danamandira a 9.20 per Merzifon.

Tabella 4. Frequenza dell'allele maggiore, numero di alleli e valori di PIC per ogni marcatore

Marker	Frequenza allele Maggiore	N campioni	N Alleli	PIC
Bl1036	0,23	157	17	0,85
BMS1226	0,24	157	13	0,83
BMS1316	0,41	157	13	0,66
BMS1352	0,34	157	8	0,73
BMS4016	0,37	157	11	0,74
BMS462	0,41	157	13	0,74
CA004	0,25	157	16	0,84
TGLA159	0,42	157	11	0,74
ILSTS058	0,29	157	15	0,83
BM1818	0,45	157	15	0,74
BM1824	0,53	157	14	0,67
INRA005	0,47	157	8	0,62
SPS115	0,39	157	9	0,69
TGLA53	0,60	157	13	0,56
TGLA227	0,32	157	12	0,69
TGLA126	0,81	157	7	0,33
ETH152	0,40	157	12	0,72
ETH10	0,87	157	11	0,24
CSSM047	0,26	157	16	0,82
BMS1747	0,27	157	18	0,86
HEL13	0,25	157	12	0,84
Mean	0,41	157	12,57	0,70

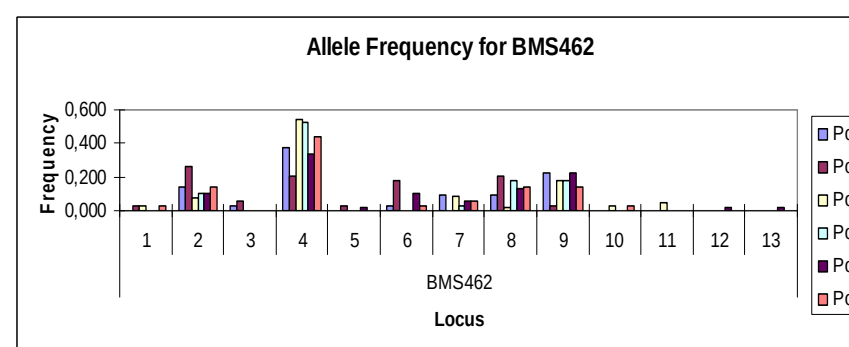
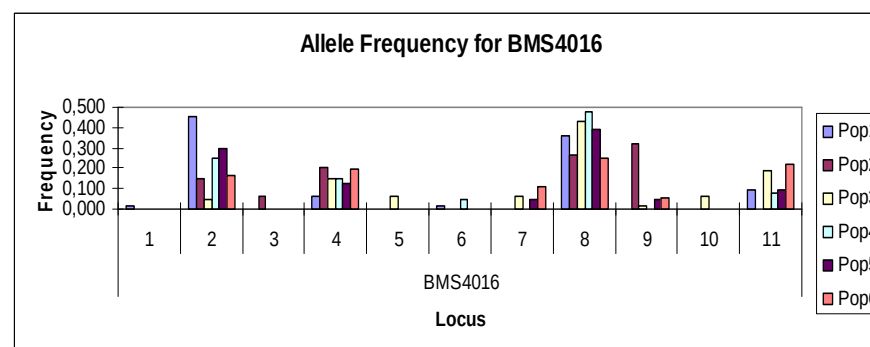
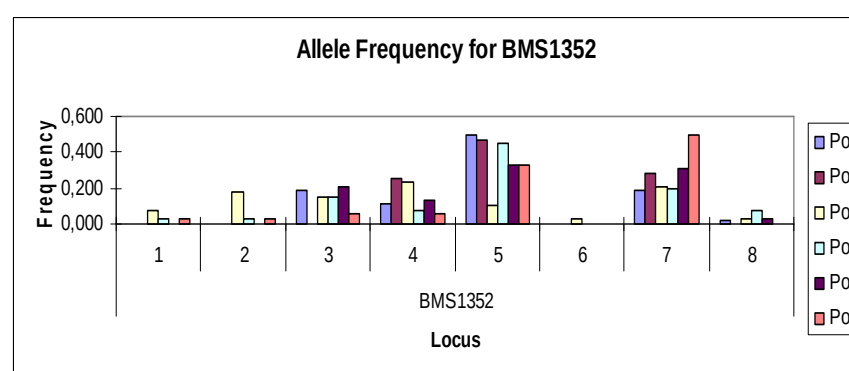
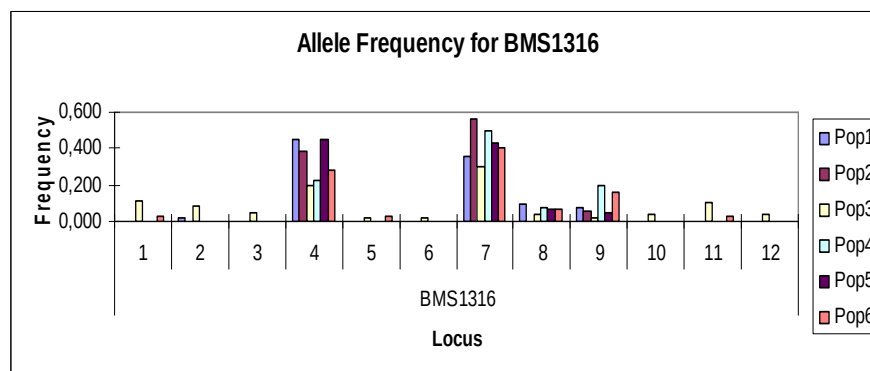
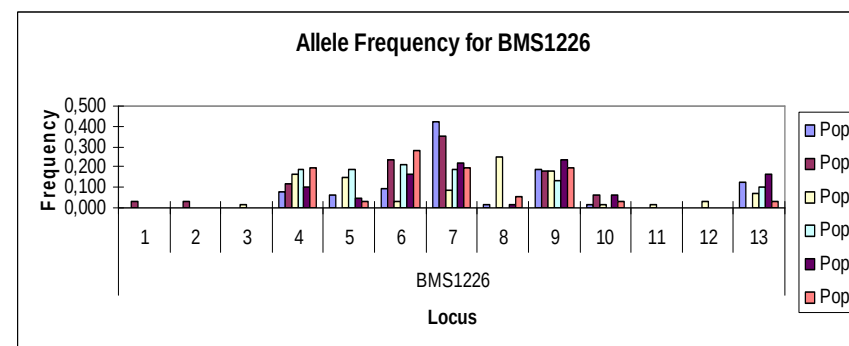
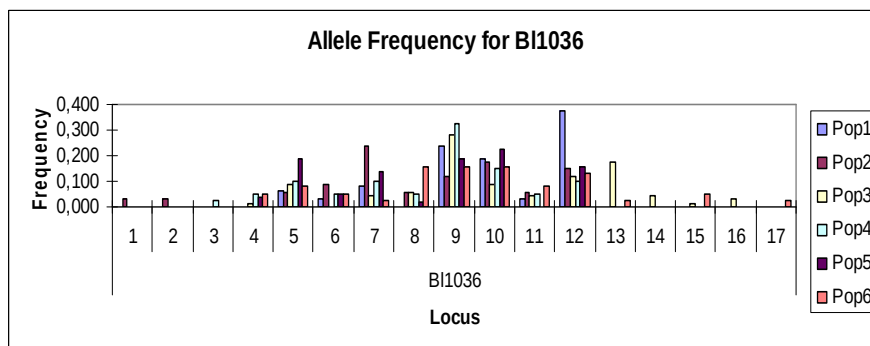


Figura 8. Frequenze alleliche per locus in ciascuna popolazione

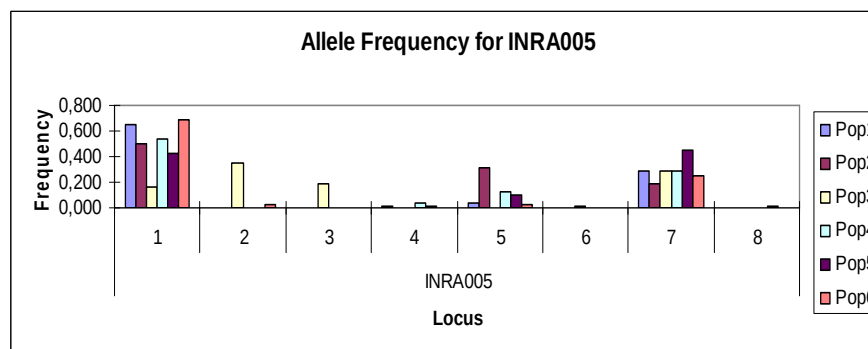
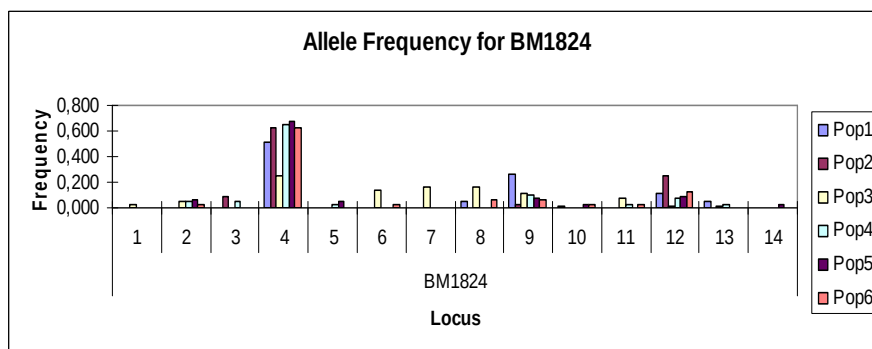
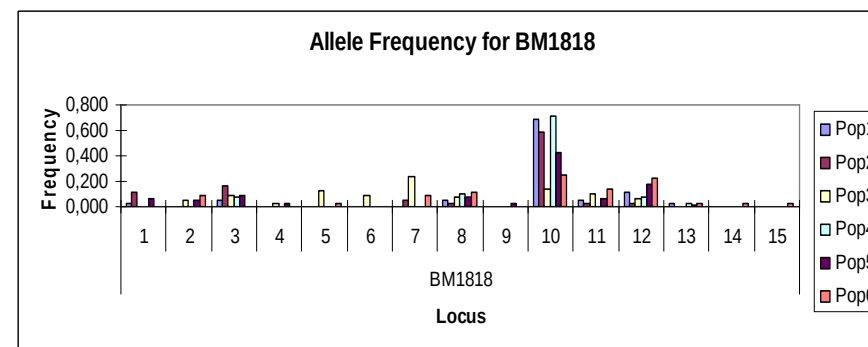
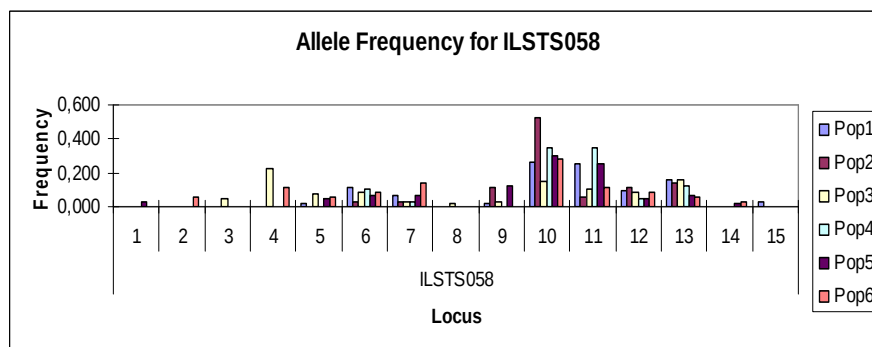
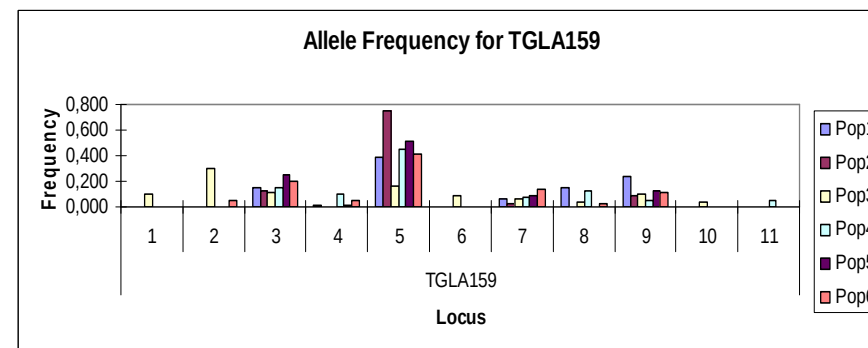
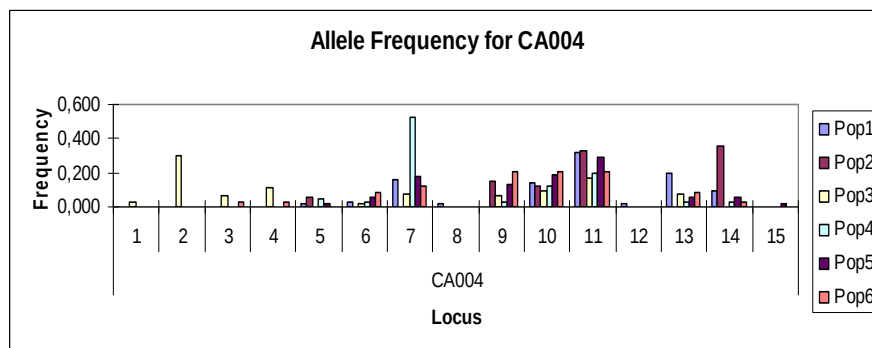


Figura 8. Frequenze alleliche per locus in ciascuna popolazione

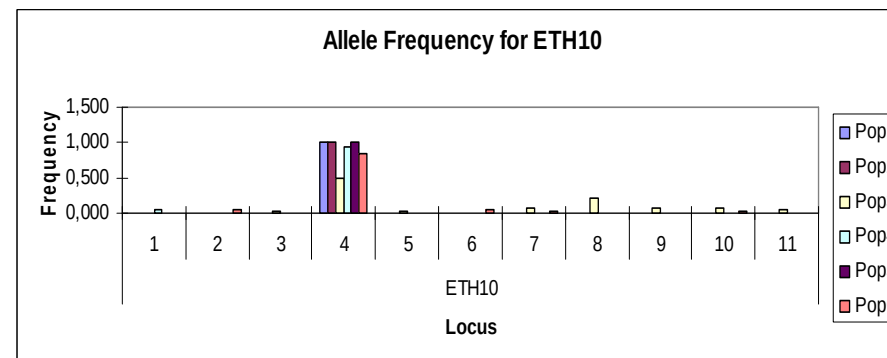
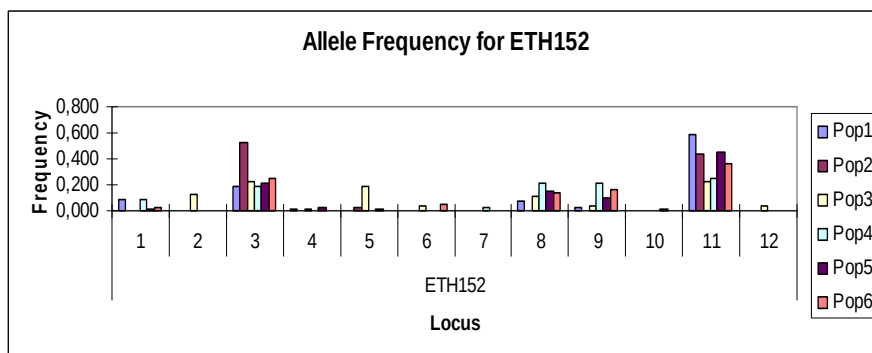
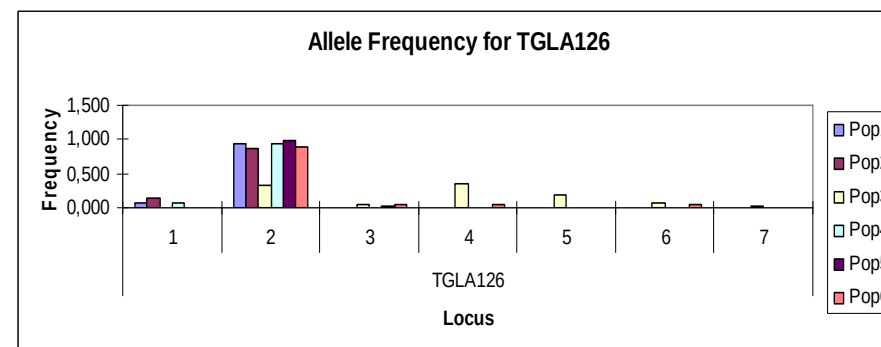
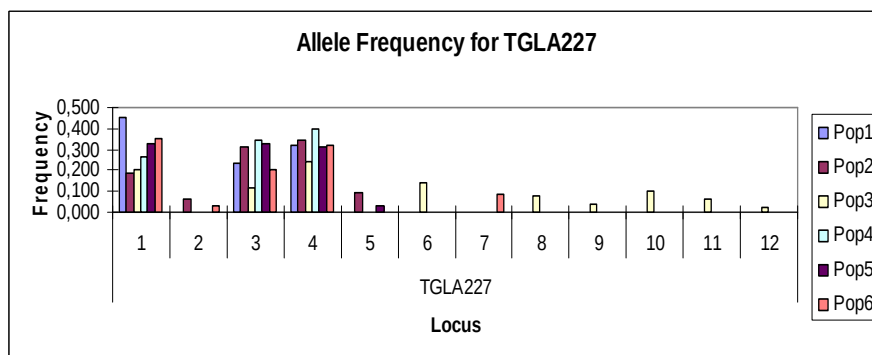
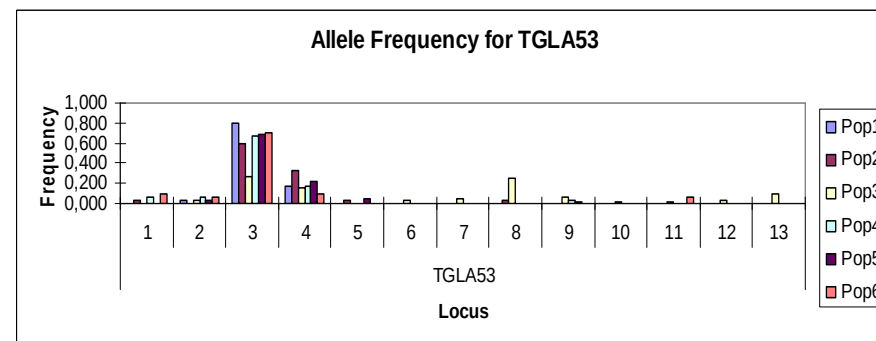
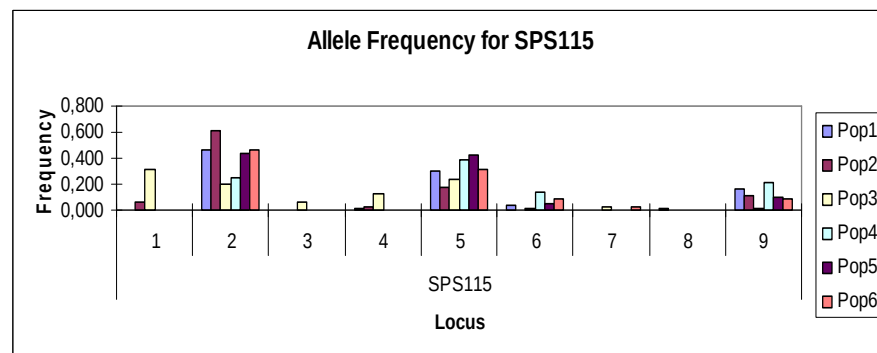


Figura 8. Frequenze alleliche per locus in ciascuna popolazione

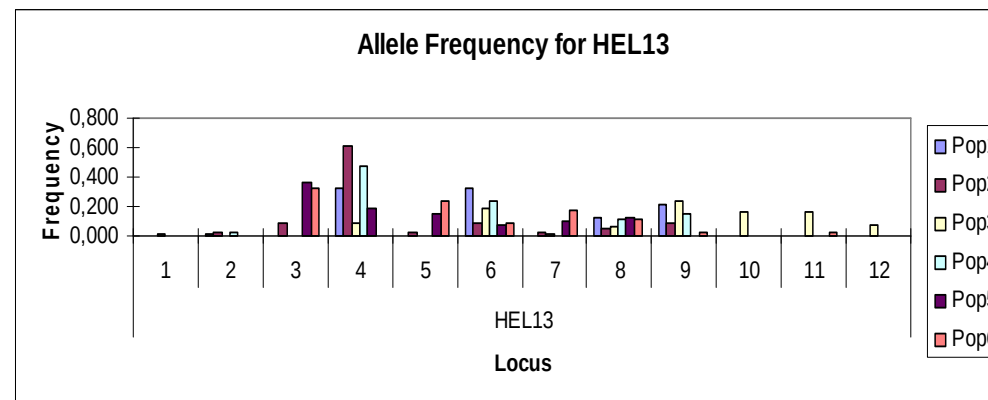
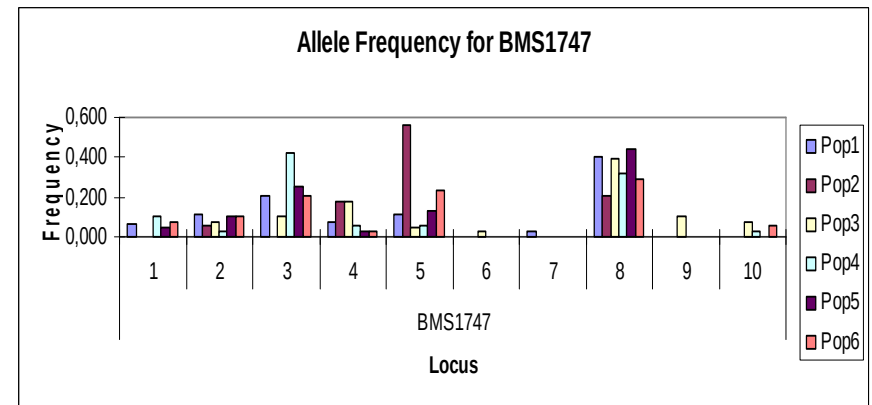
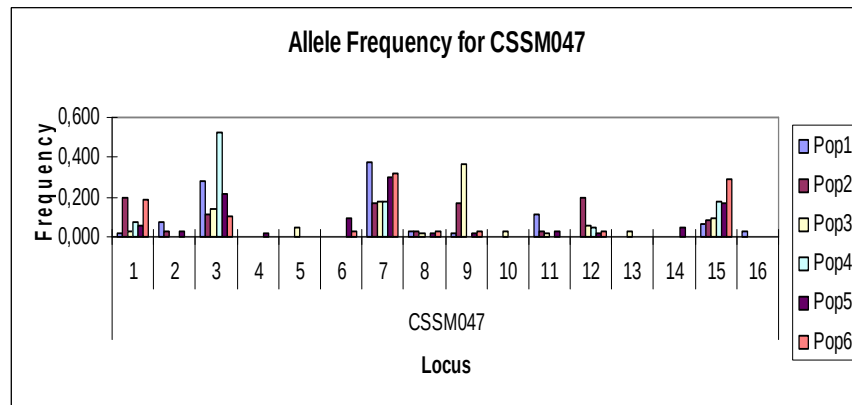


Figura 8. Frequenze alleliche per locus in ciascuna popolazione

La nostra stima del coefficiente di consanguineità (F_{IS}) variava da 0.08 (Thural) a 0,30 (Merzifon), con una media di 0,19, ed è risultata statisticamente significativa. Il livello di consanguineità rilevato nella popolazione Merzifon è probabilmente dovuto ad una diminuzione nello stock di riproduttori maschi.

Tabella 5. Indici per popolazione: n , numero di campioni; H_o , eterozigosi osservata; H_E , eterozigosi attesa; A , numero medio di alleli; F_{IS} , coefficiente di inbreeding

Popolazione	n	H_o	H_E	A	F_{IS}
Pazar	32	0.55	0.62	5.76	0.10
Danamandira	18	0.53	0.62	5.14	0.13
Merzifon	34	0.58	0.81	9.20	0.29
Thural	20	0.58	0.64	5.42	0.08
Coskun	34	0.55	0.65	6.38	0.16
Afyon	19	0.50	0.70	7.0	0.18

3.3.2. Equilibrio di Hardy-Weinberg

Per rilevare possibili deviazioni dall'equilibrio di HW ossia l'eventuale presenza di un eccesso o deficit di eterozigoti è stato utilizzato come parametro l'indice F_{IS} . L'ipotesi H_0 in questo caso è la presenza di equilibrio e può essere scartata se P è bassa (<0.05). Nel nostro studio si sono osservate deviazioni significative dall'equilibrio ($P < 0.05$), dovute a un deficit di eterozigoti, per tutti i loci in una o più popolazioni. In tabella 6 sono mostrati i loci che risultano essere in disequilibrio in ciascuna popolazione. In particolare BMS1724 è il locus che si trova più spesso in disequilibrio, mentre Merzifon è la popolazione con il più alto numero di loci in disequilibrio.

Tabella 6. Loci che si discostano significativamente ($P < 0.05$) dall'equilibrio di H-W in ciascuna popolazione

Pazar	Danam.	Merzifon	Thural	Coskun	Afyon
Bl1036	BMS1352	Bl1036	BM1824	CA004	Bl1036
BMS462	BMS4016	BMS1352	TGLA53	BM1824	BMS1226
ILSTS058	CA004	BMS462	TGLA126	INRA005	TGLA159
TGLA53	ILSTS058	CA004	ETH10	CSSM047	ILSTS058
TGLA126	BM1824	TGLA159		HEL13	BM1818
BMS1747	SPS115	BM1818			SPS115
	TGLA53	INRA005			TGLA227
	TGLA126	SPS115			ETH152
		TGLA227			
		TGLA126			
		ETH152			
		CSSM047			
		HEL13			

3.3.3. Linkage disequilibrium

Tutti i loci sono stati confrontati tra loro in tutte le popolazioni e risultano essere in linkage equilibrium. Il livello di significatività globale del test e $\alpha = 0,05$.

3.3.4. Componenti della variabilità genetica

La componente della variabilità genetica entro le popolazioni e tra le popolazioni è stata calcolata con il programma GENETIX. La misura della differenziazione delle popolazioni, come proporzione della diversità totale, è stata calcolata sia attraverso il coefficiente F_{st} di Weir & Cockerham sia attraverso il G_{st} di Nei.

I valori di F_{st} e G_{st} sono rispettivamente a 0.06 e 0.052. I valori di G_{st} indicano che la quasi totalità della variabilità genetica del campione analizzato è presente entro popolazione, la variabilità tra razze è quindi mediamente il 6% del totale. Questi risultati sono supportati dall'analisi AMOVA

(Figura 9) che mostra la percentuale della variabilità genetica dovuta alle differenze tra individui entro le popolazioni e alla differenziazione tra le popolazioni.

Inoltre sono stati calcolati i valori di F_{st} per ciascuna coppia di popolazioni. I risultati sono mostrati nella tabella 7. Il valore di F_{st} più elevato è stato misurato tra le popolazioni Merzifon e Danamandira (0.123) quello più basso tra Afyon e Coskun (0.05)

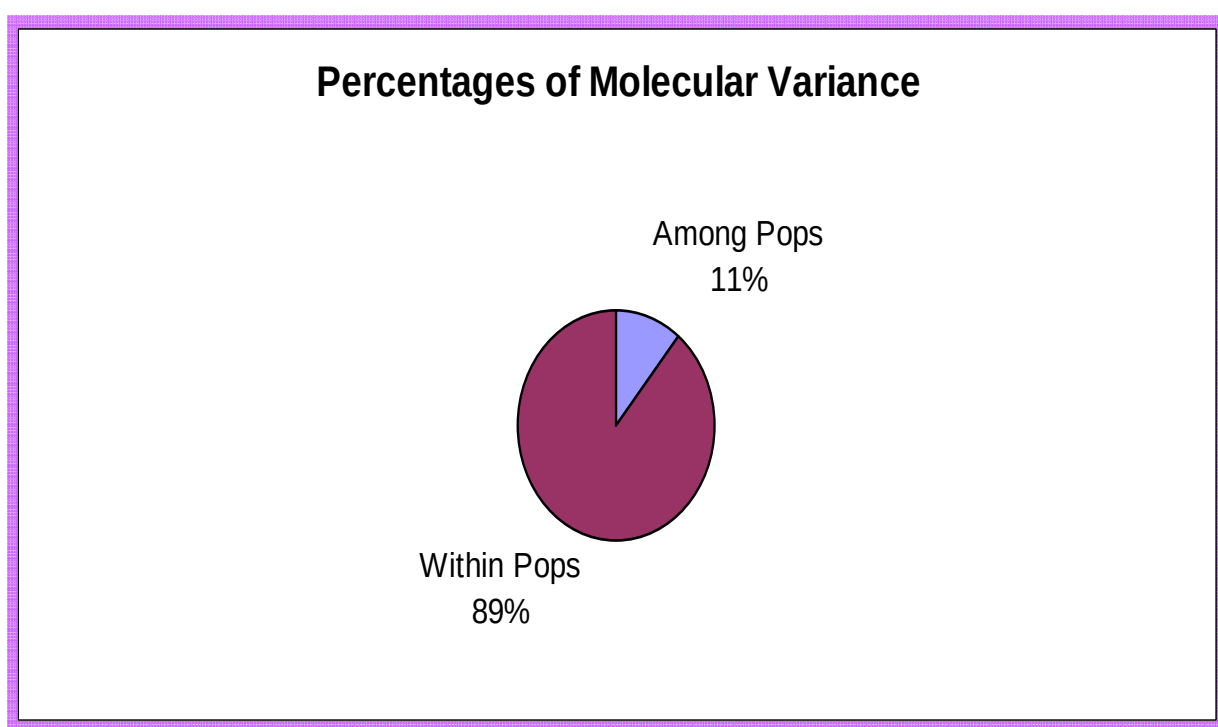


Figura 9. Analisi della varianza molecolare. Percentuale della variabilità dovuta alle differenze tra le popolazioni e all'interno delle popolazioni

Tabella 7. Valori di F_{ST} per ciascuna coppia di popolazioni

	Pazar	Danam.*	Merzifon	Thural	Coskun	Afyon
Pazar	0					
Danam.*	0,060	0				
Merzifon	0,112	0,123	0			
Thural	0,024	0,068	0,100	0		
Coskun	0,020	0,047	0,098	0,023	0	
Afyon	0,038	0,053	0,073	0,036	0,005	0

3.3.5. Bottleneck

Per testare la presenza di un eventuale collo di bottiglia è stato utilizzato il software bottleneck. I valori di probabilità associati al “Wilcoxon test” non sono risultati significativi per cui abbiamo escluso la possibilità di un recente evento di collo di bottiglia nelle popolazioni studiate.

3.3.6. Struttura delle popolazioni (PCA)

L’analisi delle componenti principali è stata effettuata con il programma GENEALEX. Questo programma, in base ai valori delle distanze genetiche, è in grado di fornire una rappresentazione grafica a due dimensioni in cui si possono visualizzare le componenti principali della variabilità a coppia. L’analisi della prima componente principale spiega il 42.80% della varianza totale, mentre la seconda il 13.78% (Figura 10). Nel grafico si distinguono tre clusters: uno formato dalle popolazioni Afyon, Coskun, Pazar e Thural, uno da Merzifon e l’ultimo da Danamandira.

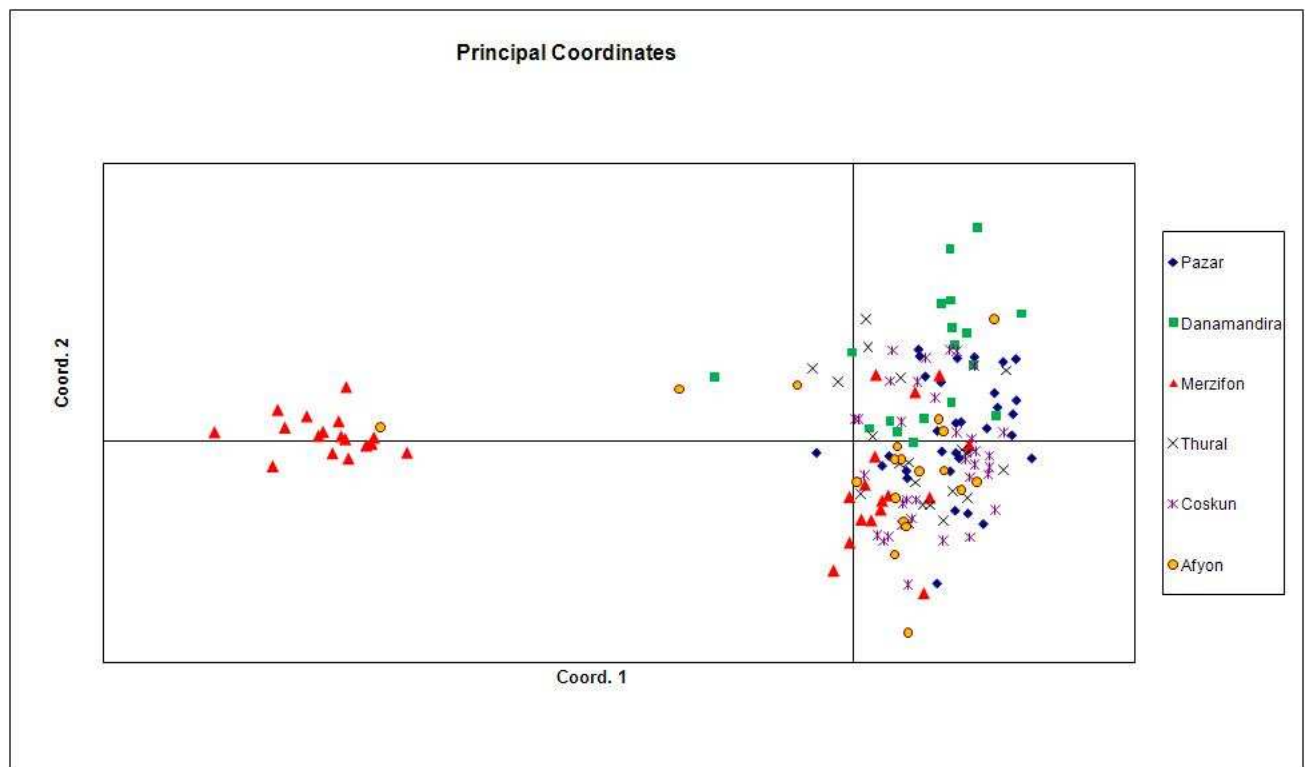


Figura 10. Analisi delle Componenti Principali basate sulle distanze genetiche. Asse1 = 42.80%, Asse2 = 13.78%

3.3.7. Structure

Per testare quale fosse il numero più probabile di raggruppamenti in cui è possibile suddividere l'intero campione è stato usato il programma STRUCTURE. Sono stati testati un numero di cluster da 2 a 7 assumendo il modello *admixture*. Sono stati stimati i valori del logaritmo naturale 'LnP(D)' (probabilità che gli individui siano ripartiti in un certo numero K di popolazioni) e i valori della varianza di 'LnP(D)' per scegliere il valore ottimale di K (Pariset *et al.* 2006). I valori di 'LnP(D)' sono massimi tra K = 3 e K = 5, mentre la varianza tra le diverse corse ha mostrato un forte incremento per K > 5. Pertanto, si può supporre che siano presenti almeno tre gruppi geneticamente distinti. In figura 11 sono rappresentati i 3 clusters identificati dal programma. Il grafico si presenta come un fittissimo istogramma in cui a ciascuno degli individui corrisponde una barra verticale, ripartita in K colori. Ogni colore rappresenta la probabilità (Q) che ogni singolo individuo ha di appartenere ad uno dei cluster. L'analisi ha mostrato un'elevata differenziazione delle popolazioni Merzifon e Danamandira, confermando quindi i risultati della PCA.

Gli individui appartenenti alla popolazione di Coskun non sono stati assegnati ad un unico gruppo, ma appaiono distribuiti nella maggior parte delle altre popolazioni di bufalo. Questo potrebbe riflettere l'eterogeneità dei riproduttori, probabilmente dovuta al fatto che gli allevatori sono soliti acquistare animali provenienti da altre regioni (Soysal comunicazione personale). Danamandira appare come un cluster ben separato; in questa popolazione, appartenente al provincia di Istanbul, l'allevamento è molto popolare e la maggior parte dei gli allevatori possiede pochi capi per consumo familiare. La maggior parte degli individui Merzifon appartiene a un distinto cluster, separato dalle popolazioni di Thural e Pazar nonostante la loro vicinanza geografica. Nel quartiere Merzifon, la dimensione della popolazione si sta riducendo, e ciò potrebbe avere provocato un aumento di consanguineità come precedentemente dimostrato dai valori di F_{IS} .

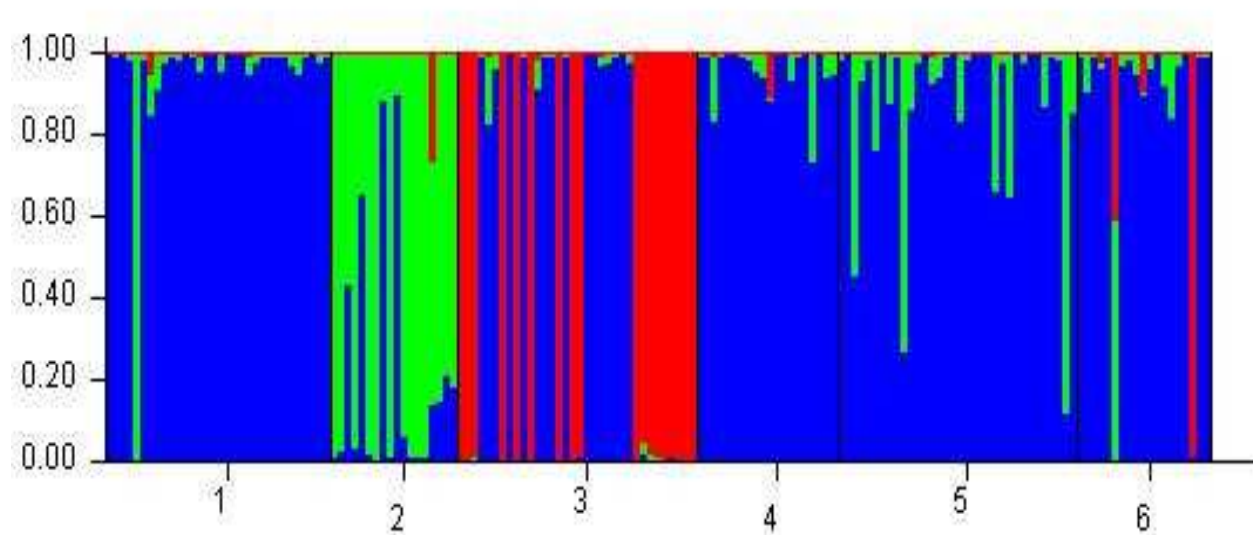


Figura 11. Ripartizioni dei valori di Q (coefficienti stimati di appartenenza per ogni individuo in ogni cluster) per $K = 3$ nelle sei popolazioni di bufalo. Ogni individuo è rappresentato da un'unica linea verticale spezzata in K segmenti colorati, con lunghezze proporzionali a ciascuno dei K dedotti. I numeri 1-6 corrispondono alle popolazioni

3.4. Discussione

Questo studio rappresenta la prima analisi genetica condotta sui bufali dell'Anatolia. Nei piccoli villaggi gli allevatori possiedono pochi capi di bestiame (2-3) che utilizzano principalmente come risorsa di latte e carne per il consumo familiare, mentre le aziende più grandi, formate da circa 100 capi, si trovano esclusivamente nelle grandi città. L'inseminazione Artificiale non è praticata nei piccoli villaggi, che generalmente condividono un maschio comune per la riproduzione.

I bufali dell'Anatolia contribuiscono all'economia soprattutto attraverso il latte e la carne che vengono utilizzati per la produzione di alcuni prodotti tipici di questa regione. Nonostante la grande importanza economica, negli ultimi decenni, secondo le statistiche FAO, si è assistito ad un decremento nel numero degli animali. Fino ad oggi sono stati pochi i programmi per migliorare le potenzialità produttive e riproduttive dei bufali dell'Anatolia.

Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare la struttura genetica di alcune popolazioni di bufali Turchi per poter programmare nuove strategie per la conservazione di questi animali.

I marcatori utilizzati per la prima volta nei bufali dell'Anatolia sono stati i microsatelliti. Questo set di *marker* è stato messo a punto specificatamente per il presente studio, in quanto essi sono specifici per il *Bos taurus*. Il primo risultato ottenuto è stato quello di aver avuto amplificazioni positive in 21 dei 26 loci testati. Inoltre i microsatelliti sono risultati molto informativi per le analisi della genetica di popolazioni, infatti abbiamo ottenuto valori di PIC maggiori di 0.5 per tutti i loci.

Per quanto riguarda le analisi genetiche, le sei popolazioni analizzate mostrano un moderato livello di diversità. L'eterozigosità osservata media è pari a 0.55, valore simile a quello trovato in studi condotti sui bufali Asiatici (Baker *et al.* 1997a), Cinesi (Zang *et al.* 2007) e Italiani (Moioli *et al.* 2001), ma più bassi di quelli riportati per i bufali Indiani (Kumar *et al.* 2006) e Africani (Van Hooft *et al.* 2000).

I valori di *Gst* indicano che la quasi totalità della variabilità genetica del campione analizzato è presente entro popolazione, la variabilità tra le popolazioni è mediamente il 6% del totale. Questo valore è più basso rispetto a quelli ottenuti in altri studi condotti sui bufali Asiatici (16.8%, Backer *et al.* 1997), è più alto rispetto a quelli riportati per i bufali Indiani (3.4%) (Kumar *et al.* 2006) e Cinesi (2.8%) (Zang *et al.* 2007).

Il test per l'equilibrio di Hardy-Weinberg, mostra che alcuni *loci* non sono all'equilibrio a causa di un deficit di eterozigoti. Alcuni fattori come l'inbreeding e la sottostrutturazione delle popolazioni possono essere la causa di un deficit di eterozigoti. Noi ipotizziamo che l'inbreeding sia la causa più

probabile. I valori del coefficiente di inbreeding infatti risultano essere tutti positivi e significativi. In particolare la popolazione Merzifon mostra il valore di Fis più alto di tutti (0,29) .

Per quanto riguarda la struttura genetica delle popolazioni, i risultati ottenuti dall'analisi delle componenti principali e dall'analisi Bayesiana hanno mostrato una netta differenziazione delle popolazioni Merzifon e Danamandira. Per quanto riguarda le altre popolazioni, esse appaiono raggruppate in un unico cluster. Inoltre l'analisi Bayesiana mostra che gli individui appartenenti a Coskun sono distribuiti in tutte le altre popolazioni, riflettendo, probabilmente, il fatto che gli allevatori sono soliti acquistare animali provenienti da altre regioni.

In conclusione, abbiamo presentato il primo studio di diversità genetica dei bufali dell'Anatolia usando marcatori microsatelliti. In particolare abbiamo trovato un discreto livello di diversità genetica e abbiamo distinto tre clusters tra le sei popolazioni testate. Questi risultati preliminari potrebbero essere utili per pianificare strategie di conservazione del bufalo della Turchia, che rappresenta un'importante risorsa economica soprattutto per i piccoli villaggi. In particolare la popolazione di Merzifon merita una speciale attenzione al fine di impedire un ulteriore aumento dei valori di inbreeding.

4. Analisi di microsatelliti in resti bovini risalenti al Medioevo

4.1. Studio del DNA antico

I processi evolutivi che hanno generato le specie e le popolazioni moderne sono comunemente dedotti attraverso lo studio di marcatori morfologici e genetici. Tuttavia, le analisi di organismi contemporanei possono fornire solo una prova indiretta di questa storia. Lo studio del DNA antico (aDNA) può essere un mezzo per superare il problema e registrare i cambiamenti genetici in tempo reale. Con il termine “DNA antico” viene indicata una qualsiasi traccia di DNA proveniente da materiale biologico di diversa origine, diverso stato di conservazione e diversa età come ossa, denti, corpi mummificati, sangue coagulato, capelli, coproliti (escrementi fossili) di organismi morti. Il DNA estratto da campioni antichi presenta alcune caratteristiche come lo stato di frammentazione dei filamenti, la presenza di basi modificate e di legami tra il DNA e le proteine. Queste caratteristiche, insieme ai problemi di contaminazione da parte di DNA esogeno, rendono difficile le analisi dell’aDNA.

Le prime ricerche risalgono al 1984, quando Higuchi e collaboratori riuscirono ad estrarre e a clonare il DNA del *quagga*, un equide simile alla zebra attuale estinto 150 mila anni fa. I risultati dimostrarono che la sequenza del DNA mitocondriale del *quagga* era indistinguibile da quella della zebra attuale. L’anno successivo Pääbo (1985) riuscì ad estrarre per la prima volta il DNA di una mummia egiziana. La clonazione e l’analisi di una breve sequenza nucleotidica portò all’identificazione di due membri della cosiddetta *Alu*.

Questi primi tentativi, però, incontrarono ostacoli dovuti in particolar modo alla frammentazione della doppia elica e al basso numero di molecole di DNA. Questi problemi sono stati in parte superati grazie alle tecniche di biologia molecolare. La tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR), infatti, consente di amplificare in maniera specifica quantità estremamente piccole di DNA, addirittura singole molecole. Inoltre la stessa sequenza di DNA può essere amplificata diverse volte dallo stesso campione. Per questo motivo la PCR è lo strumento ideale per tali studi, tanto che negli ultimi anni si sono accumulati moltissimi dati su resti antichi di origine umana, animale e vegetale. È diventato così possibile lo studio sia di geni nucleari, che seguono regole di ereditarietà mendeliana, sia di geni mitocondriali (mtDNA) ereditati solo per via materna, utilizzando campioni di aDNA di diversa provenienza e differente datazione.

Nonostante i progressi ottenuti in questo campo, grazie alla reazione di PCR, restano tuttavia due principali problemi nell'analisi del DNA proveniente da resti antichi: la degradazione del DNA e la contaminazione dei reperti con DNA esogeno.

4.1.1. Degradazione del DNA

All'interno delle cellule viventi, l'integrità delle molecole di DNA è costantemente mantenuta dai processi di riparazione enzimatici (Lindahl 1993). Dopo la morte di un organismo, i compartimenti cellulari, che normalmente sequestrano gli enzimi catabolici, vengono distrutti. Di conseguenza, il DNA è rapidamente degradato da enzimi come le nucleasi lisosomiali. Inoltre, la molecola del DNA è soggetta agli attacchi di batteri, funghi e insetti che degradano le macromolecole (Eglinton *et al.* 1991). In circostanze rare, come ad es. la rapida essiccazione di un tessuto post-mortem o l'assorbimento del DNA da una matrice minerale, i processi di degradazione enzimatica e microbica possono subire un rilevante rallentamento. Molti di questi processi sono simili o identici a quelli che interessano il DNA delle cellule viventi, ma in assenza dei processi di riparazione che interessano queste ultime, i danni si accumulano progressivamente fino a che il DNA perde la sua integrità e si decompone, con un'irreversibile perdita d'informazioni nella sequenza nucleotidica.

Il danno più evidente al DNA estratto da resti fossili è la sua degradazione a piccole dimensioni, generalmente comprese tra i 10-500 paia di basi (Hofreiter *et al.* 2001, Pääbo 1989). La riduzione delle dimensioni è dovuta sia a processi enzimatici che si verificano subito dopo la morte, sia a processi non enzimatici come la scissione idrolitica del legame fosfodiesterico nello scheletro zucchero-fosfato (Lindahl 1993, Shapiro 1981) che genera nick a singolo filamento. I legami glicosidici tra le basi azotate e lo zucchero sono, inoltre, soggetti a scissione idrolitica che porta alla formazione di siti privi della base (Lindahl & Karlstro 1973, Lindahl & Nyberg 1972, Schaaper *et al.* 1983). L'entità del degrado causato da questi processi dipende dalla conservazione del campione e può variare anche tra gli esemplari della stessa età. La frammentazione dei filamenti di DNA, quindi, non consente di amplificare tramite PCR frammenti lunghi.

Un altro fattore che influisce negativamente sul successo di amplificazione bloccando la Taq DNA polimerasi, è rappresentato da alcune lesioni che sono indotte dai radicali liberi come il perossido di idrogeno. I principali siti di attacco ossidativo sono i doppi legami delle pirimidine e purine, e i legami chimici dei residui di deossiribosio che portano ad una frammentazione dell'anello di zucchero. In alcuni studi è stato dimostrato che i resti antichi di diversa provenienza ed età contengono residui di basi ossidate (Hoss *et al.* 1996). In particolare, le sequenze di DNA

provenienti da campioni che avevano più di due pirimidine ossidate non potevano essere amplificate tramite PCR (Hoss *et al.* 1996).

Un altro tipo di danno al DNA è il legame crosslink che blocca la DNA polimerasi. Questi legami si formano dalla reazione di condensazione tra gli acidi nucleici e i gruppi amminici delle proteine. Il trattamento con il reagente, N-phenacylthiazolium bromuro (Vasan *et al.* 1996), che rompe i legami di crosslink, consente l'amplificazione di sequenze di DNA altrimenti impossibile.

Oltre alla frammentazione e alle altre modifiche che interessano il DNA antico e che come abbiamo visto impediscono la reazione di PCR, ci sono altri fattori che rendono difficile l'analisi della sequenza. Tra questi la perdita del gruppo amminico da parte delle basi azotate, che porta ad una modificazione delle basi stesse. Così la deamminazione causa la trasformazione dell'adenina in hipoxantina, della citosina in uracile e della 5metilcitosina in timidina. Queste modificazioni sono di particolare importanza quando si studia il DNA antico, in quanto causano un errato inserimento di una base, nel momento in cui viene sintetizzata una nuova elica di DNA.

Si evince facilmente che queste lesioni nel DNA antico non fanno altro che complicare la determinazione corretta delle sequenze. Per affrontare queste difficoltà è necessario distinguere le incorporazioni sbagliate dovute all'elica stampo di partenza da quelle che avvengono durante la PCR per opera della DNA polimerasi. E' utile ai fini delle indagini, in questi casi, allestire amplificazioni diverse partendo dal DNA estratto e clonare i prodotti di PCR. Il confronto tra le sequenze di più cloni che derivano da diverse amplificazioni può permettere di rilevare le differenze nucleotidiche che caratterizzano tutti i cloni della stessa amplificazione rispetto a quelli di altre. Se le sostituzioni si osservano in tutti i cloni della stessa amplificazione, ma non nei cloni di amplificazioni diverse, allora è probabile che l'incorporazione sbagliata del nucleotide avviene nel primo ciclo della PCR e quindi l'errore sarà presente in tutte le molecole che ne derivano. In questo caso quindi l'incorporazione sbagliata è dovuta proprio alle modificazioni come le deamminazioni che sono presenti sull'elica stampo. Se, invece, le sostituzioni interessano solo pochi cloni che derivano dalla stessa amplificazione, allora l'incorporazione del nucleotide sbagliato dipenderà molto probabilmente dagli errori che l'enzima Taq polimerasi compie nei cicli successivi al primo. Alcuni metodi sono stati usati per superare i problemi dovuti alle modificazioni post-mortem del DNA e aumentare la quantità e la qualità del templat amplificabile. Ad es. l'uracil-N Glicosilasi (UNG) rimuove i prodotti di deamminazione delle citosine; il bromuro di fenaciltiazolo (PTB) sembra rompere i legami cross-link intermolecolari sebbene rimanga poco chiaro il loro modo di operare; le Polimerasi ad alta fedeltà come la *Pfu* e la *TacHiFi* diminuiscono il tasso di errore e aumentano l'efficienza di amplificazione.

E' chiaro che le basse temperature costanti giocano un ruolo centrale nella longevità di molecole di aDNA (Lindahl 1993; Hofreiter *et al.* 2001b; Smith *et al.* 2001; Willerslev *et al.* 2004b). I più antichi studi riconosciuti del aDNA derivano da fossili rinvenuti in ambienti preservati dal permafrost: il mtDNA di mammut risalente ad oltre 50 mila anni BP (Hoss *et al.* 1994); l'mtDNA di bisonte risalente a 65 mila anni BP (Gilbert *et al.* 2004a) e il DNA dei cloroplasti di piante risalenti a 300-400 mila anni fa (Willerslev *et al.* 2003). Inoltre, le ossa rinvenute negli stessi ambienti risalenti all'Olocene e Pleistocene hanno dato prodotti di amplificazione di 900-1000 bp (Barnes *et al.* 2002). Altre caratteristiche, come la rapida essiccazione e le alte concentrazioni di sale, possono anche prolungare la sopravvivenza del DNA (Lindahl 1993). Tuttavia, i calcoli cinetici prevedono che piccoli frammenti di DNA (100-500 bp), sopravvivano per non più di 10 mila anni nelle regioni temperate e per un massimo di 100 mila anni a latitudini più fredde (Smith *et al.* 2001). Anche in condizioni ideali il DNA amplificabile non può sopravvivere per più di 1 milione di anni.

4.1.2. Contaminazione del DNA

Nel corso del tempo i resti antichi vanno incontro a contaminazioni dovute, normalmente, a microorganismi che degradano e impoveriscono il DNA originale arricchendolo, contestualmente, del loro.

Tuttavia, le moderne tecniche di analisi molecolare (PCR) consentono di discriminare nei resti umani tra componente primaria e componente batterica degli acidi nucleici.

Altro e non meno importante fattore di contaminazione è rappresentato dalla sequela di manipolazioni del campione, dovute all'attività dell'archeologo e di altri soggetti interessati al reperto (antropologo molecolare) per studi paralleli: il materiale molecolare in forza di tal contatti subisce un progressivo "inquinamento" da parte di materiale cellulare umano, di modo che il prodotto di risulta è una miscela di DNA endogeno e di DNA contaminante.

Quella testé descritta è la principale forma di contaminazione. A questa va aggiunta quella dovuta a molecole di DNA già amplificate presenti in elevate concentrazioni: si tratta della contaminazione causata, nelle varie fasi sperimentali, dalle apparecchiature e dai reagenti utilizzati.

I protocolli applicati nei laboratori di ricerca, imponendo l'uso di guanti, mascherine, cuffie, camici sterili mirano a prevenire e controllare tale inquinamento ambientale. I laboratori del DNA antico devono essere completamente isolati logisticamente, preferibilmente in edifici che non siano in

rapporto di contiguità con altri dove si lavora con DNA moderno. E' indispensabile, poi, creare nei laboratori delle zone di pre-amplificazione e delle zone di post-amplificazione. I reagenti utilizzati negli esperimenti devono essere aliquotati sterilmente nelle quantità strettamente necessarie per la lavorazione del singolo campione, onde evitarne un uso ripetuto. Durante le fasi sperimentali (estrazione, purificazione ed amplificazione) devono essere effettuati dei controlli sullo stato dei reagenti in modo da accertarne continuamente la mancata contaminazione.

Sia l'estrazione che l'amplificazione vengono allestite sotto cappe dotate di raggi uv a 254 nm che vengono posti in funzione per circa 30 minuti prima della fase sperimentale. Nell'ambiente protetto della cappa devono essere introdotte solamente le mani dell'operatore. Ulteriore accorgimento da adottare nei laboratori di DNA antico e la tipizzazione, in apposito e distante reparto, del DNA degli operatori, in modo da poterlo identificare qualora venisse accidentalmente amplificato insieme o in luogo del DNA antico.

Più complicati sono i metodi tesi a superare la contaminazione già presente nel campione prima del suo uso sperimentale. In alcuni casi è possibile eliminare la parte superficiale del campione (maggiormente contaminata) con abrasivi o eseguendo carotaggi se si tratta di materiale osseo. Tali operazioni non sono effettuabili in presenza di campioni particolarmente labili o di ridotte dimensioni.

Per superare questi problemi sono stati introdotti una serie di criteri progettati per garantire la qualità dei dati sul DNA antico. Partendo da alcuni suggerimenti relativamente semplici (ad esempio l'utilizzo di controlli negativi, analisi di più estratti per campione, e l'osservazione di una correlazione inversa tra l'efficienza di amplificazione e dimensione del prodotto di amplificazione, Paabo 1989), le linee guida si sono evolute nel tempo (Handt *et al.* 1994) fino ad arrivare, con Cooper e Poinar 2000, ad una più lunga e dettagliata lista di requisiti riportata di seguito:

1. I prodotti di amplificazione devono essere clonati in vettori plasmidici e alcuni degli inserti sequenziati. Questo procedimento permette di verificare la presenza di eterogeneità nel prodotto amplificato.
2. In ogni estrazione di DNA e in ogni reazione di PCR devono essere sempre presenti controlli negativi (bianchi). Infatti, poiché le contaminazioni che provengono dai reagenti del laboratorio vengono rilevate solo sporadicamente nei bianchi di PCR, in ogni esperimento devono essere condotte diverse amplificazioni (tre) che contengono tutti i reagenti ad eccezione del DNA template.

3. Devono essere eseguite più estrazioni e il DNA ottenuto da ciascuna di essa, viene amplificato più volte tramite PCR. Questo metodo è utile, in primo luogo, per individuare contaminazioni che sono avvenute in una particolare estrazione o amplificazione. In secondo luogo quando nel campione di partenza sono presenti poche copie di template, le aliquote delle estrazioni possono solo sporadicamente contenere molecole di DNA. Se dopo tre estrazioni dello stesso campione non si ottiene DNA amplificabile, il campione può essere eliminato dallo studio. In ultimo l'incorporazione di nucleotidi errati, può essere rilevata solo quando vengono condotte amplificazioni multiple.
4. Deve essere quantificato il numero di molecole amplificabili presenti in ogni estrazione. Questo permette di prevedere la probabilità di incorporazioni sbagliate dei nucleotidi dovute al danneggiamento del DNA antico ad opera della deaminazione. Se nell'estratto è presente un numero di molecole $>$ di 1000 e ci si aspetta di trovare un solo tipo di sequenza, allora non è necessario effettuare amplificazioni multiple dal momento che è difficile incorrere in errori di questo genere. Al contrario, se la concentrazione del DNA di partenza è bassa, allora dovranno essere allestite PCR multiple (punto 1). Il modo più economico per procedere è quello di effettuare due PCR e sequenziare alcuni cloni per ciascuna di esse. Se le sequenze mostrano delle discordanze, è necessario eseguire una terza PCR per verificare quale delle due sequenze è da prendere in considerazione.
5. Nell'analisi dei reperti antichi si osserva una correlazione inversa tra l'efficienza di amplificazione e la lunghezza dell'amplificato. In letteratura sono riportate differenze nella lunghezza dei frammenti amplificati a seconda delle specie prese in esame. In generale se i frammenti corti non sono amplificati più facilmente di quelli lunghi quando confrontati con le sequenze di DNA moderno, allora probabilmente c'è una contaminazione da DNA moderno.
6. Devono essere fatte analisi biochimiche per valutare il grado di preservazione dei campioni. Nei campioni caratterizzati da un buon grado di conservazione, ci aspettiamo di trovare anche la molecola del DNA ben conservata. Tra queste indagini la più usata è l'analisi degli amminoacidi presenti nel campione e la misura della loro grado di preservazione. La combinazione tra la misura della quantità degli amminoacidi, la loro composizione e il loro grado di racemizzazione è un mezzo per stabilire il grado di preservazione di ossa e denti. Reperti che contengono pochi amminoacidi altamente racemizzati, e possiedono una composizione degli stessi in cui le loro macromolecole sono state sostituite dai microrganismi, molto probabilmente non conterranno DNA endogeno. Altri metodi

consistono nella stima, attraverso la spettrometria di massa, del rapporto tra frammenti peptidici e singoli amminoacidi, nel determinare il danno del DNA attraverso la gas cromatografia, nella valutazione diretta dell'istologia dell'osso

7. Frammenti di DNA derivanti dai genomi di organelli come i mitocondri sono spesso presenti come inserzioni nel DNA nucleare della specie di interesse. Non è possibile purificare il DNA degli organelli dai reperti e le inserzioni nucleari non sono distinguibili dalla sequenza originale dell'mtDNA. Per risolvere questo problema, possono essere usati differenti primers per amplificare frammenti che si sovrappongono e clonare i prodotti di PCR.
8. Ai fini dell'autenticazione degli studi del DNA antico è necessario che i campioni siano analizzati e i risultati siano riprodotti in altri laboratori. Lo scopo è sempre quello di controllare eventuali contaminazioni che possano essersi verificate in un laboratorio ma non in un altro. La replica in un altro laboratorio, pertanto, rappresenta una precauzione in più al fine di escludere eventi improbabili di contaminazione che potrebbero essere sfuggiti nei controlli effettuati durante le fasi di estrazione e amplificazione.

In generale, è di fondamentale importanza prendere in considerazione tutti i criteri sopra elencati in uno studio del DNA antico. Tuttavia, se i controlli negativi per l'estrazione e la PCR devono sempre essere effettuati, le amplificazioni multiple da uno stesso estratto possono essere evitate se la quantificazione rivela la presenza di una buona quantità di DNA (migliaia di molecole). Anche le analisi biochimiche di conservazione possono essere superflue quando i campioni sono ovviamente ben conservati. Tuttavia, quando conclusioni di grande significato biologico dipendono dall'autenticità di una particolare sequenza di DNA antico, molti o tutti i criteri dovrebbero essere rispettati, compresa la ripetizione in un secondo laboratorio per escludere la presenza di un contaminante di laboratorio non rilevato.

4.1.3. DNA nucleare e DNA mitocondriale

Gli studi condotti sul DNA antico sono in gran parte basati sulle analisi del DNA mitocondriale (mtDNA). Esso è presente in gran numero di copie, a differenza di quanto avviene per i geni nucleari di cui si hanno solo due copie per cellula, e per tale ragione, esiste un'elevata probabilità di ritrovarlo ancora in campioni antichi. L'amplificazione di corti frammenti di mtDNA che si sovrappongono, permette di ricostruire parte delle sequenze del genoma mitocondriale. Recenti sviluppi nelle tecnologie di sequenziamento del DNA, tuttavia, stanno offrendo nuove opportunità

per l'esame di materiale genetico estratto da specie estinte, fornendo una nuova visione della loro storia evolutiva. Alcuni genomi mitocondriali sono stati completamente sequenziati, come quello del *Bos. primigenius* (Edwards *et al.* 2010) e quello di Neanderthal (Green *et al.* 2008). All'interno del genoma mitocondriale la regione di controllo (D-loop) è quella maggiormente indagata negli studi evoluzionistici. Il D-loop è una regione non codificante con un alto tasso di mutazione ovvero presenta un'alta variabilità inter e intra-specifica. L'mtDNA è particolarmente utile nello studio della filogenesi: in primo luogo, è ereditato dalla madre e quindi non subisce ricombinazione, in secondo luogo, il tasso di evoluzione del DNA mitocondriale è molto più alto di quello di geni nucleari.

Il DNA nucleare è stato uno strumento d'indagine poco sfruttato per lo studio del DNA antico in quanto è maggiormente degradato rispetto al DNA mitocondriale. Tuttavia alcuni studi hanno dimostrato la possibilità di ottenere sequenze nucleari in singola copia da materiale antico (Huynen *et al.* 2003). Tra i marcatori nucleari, i più informativi sono sicuramente i microsatelliti per l'elevata variabilità. I microsatelliti sono stati ad esempio utilizzati per l'identificazione della famiglia dei Romanov da alcuni reperti ossei (Gill *et al.* 1994). Più recentemente nel 2003 il gruppo di Edwards ha dimostrato la possibilità di utilizzare i marcatori microsatelliti su 19 reperti ossei bovini rinvenuti a Dublino e risalenti al X secolo.

4.1.4. Applicazioni dello studio del DNA antico

Filogenesi delle specie. Attraverso la filogenesi molecolare è possibile confrontare le specie estinte con quelle moderne. Ad esempio uno studio condotto da Krajewski e collaboratori nel 1997 attraverso l'uso dell'mtDNA, ha mostrato che il lupo marsupiale dell'Australia ha una correlazione maggiore con altri marsupiali australiani rispetto a quella con i marsupiali carnivori del Sud America. Ciò significa che molte delle caratteristiche morfologiche che i lupi marsupiali condividono con i carnivori marsupiali sudamericani, si sono evolute in modo indipendente sui due continenti. Un altro studio (Cooper *et al.* 1992) è quello effettuato sui moa, uccelli estinti della Nuova Zelanda incapaci di volare ed apparentemente simili ai kiwi esistenti oggi in Nuova Zelanda e agli emù dell'Australia. L'analisi del mtDNA ha dimostrato che i moa sono legati più strettamente agli emù piuttosto che agli attuali kiwi. Questo indica che la Nuova Zelanda è stata colonizzata due volte da uccelli incapaci di volare.

E' anche diventato possibile studiare la genetica delle popolazioni risalenti al tardo Pleistocene, il tempo prima e durante l'ultima era glaciale. Così, nel 2000 Leonard e collaboratori hanno condotto uno studio sugli orsi bruni dell'Alaska risalenti al tardo Pleistocene. Considerando che le linee

maternali del mitocondriale dell'orso bruno oggi sono ben distribuite in diverse aree geografiche del mondo, questo studio ha dimostrato che le stesse linee coesistevano in una singola area circa 35.000 anni fa.

Nel 2002 Barnes e collaboratori in uno studio condotto sugli orsi bruni dell'Alaska risalenti al tardo Pleistocene, hanno dimostrato che i maggiori cambiamenti filogeografici sono avvenuti circa 35,000-21,000 anni prima dell'Ultima Glaciazione e che la struttura genetica delle popolazioni, che si è formata nel tempo, persiste fino ad oggi.

Questi e altri studi in corso mostrano che possiamo ora cominciare a ricostruire la storia delle popolazioni di animali estinti, andando indietro nel tempo, ben prima dell'ultima Era glaciale.

Ominidi. Lo studio delle sequenze del DNA antico per la comprensione della recente storia umana ha incontrato diversi problemi dovuti alla frequente contaminazione da DNA umano moderno e dal fatto che molte popolazioni moderne condividono sequenze di DNA identiche, anche nel genoma mitocondriale. Il DNA antico ha, tuttavia, fatto luce sul rapporto tra gli uomini moderni, che si diffusero dall'Africa verso il resto del mondo circa 100.000 anni fa, e i loro precursori in Europa, i Neandertal. Questi ultimi vissero in Europa e Asia occidentale circa 300.000 anni fa fino a scomparire 30.000 anni fa. Utilizzando i reperti fossili e le testimonianze culturali, alcuni paleontologi ritengono che l'uomo di neandertal sia l'antenato degli Europei moderni, avendo contribuito dal punto di vista genetico alle moderne popolazioni umane (Duarte *et al.* 1999, Hawks & Wolpoff 2001, Trinkaus & Duarte 2000, Wolpoff *et al.* 2001). Tuttavia, la maggior parte dei paleontologi (Stringer 2002, Stringer & Andrews 1988) interpreta gli stessi dati con una sostituzione completa o quasi completa di neandertal da parte degli esseri umani moderni. Lo studio del DNA antico ha fornito un modo per testare direttamente le previsioni di queste due ipotesi. L'analisi di un segmento di 380 bp della regione ipervariabile del genoma mitocondriale di Neandertal e il paragone con la stessa regione dell'uomo moderno, ha evidenziato una notevole differenza tra le due sequenze. Inoltre nelle analisi degli alberi filogenetici, l'mtDNA di Neandertal cade al di fuori della variazione degli umani moderni (Krings *et al.* 1997). Questo risultato è stato in seguito confermato dallo studio di più sequenze di mtDNA di uno stesso individuo (Krings *et al.* 1999), nonché dalla determinazione di sequenze dell' mtDNA di tre individui Neandertal (Krings *et al.* 2000, Ovchinnikov *et al.* 2000, Schmitz *et al.* 2002).

Patogeni. Una potenzialmente applicazione del DNA antico è lo studio di agenti patogeni quali batteri e virus. Un gran numero di lavori segnalano il recupero di batteri, come *Mycobacterium tuberculosis* (Fletcher *et al.* 2003, Haas *et al.* 2000, Zink *et al.* 2001) e *Yersinia pestis* (Drancourt *et al.* 1998, Raoult *et al.* 2000), così come del virus dell'influenza della grande epidemia del 1918

(Reid *et al.* 1999). Questo è un settore potenzialmente molto emozionante perché ci si può aspettare che l'evoluzione di alcuni agenti patogeni sia abbastanza veloce da permettere di seguire i cambiamenti genetici avvenuti nel corso di decenni o secoli. Tuttavia, le potenziali fonti di contaminazione possono esistere anche in questi casi. Ad esempio, i batteri del suolo possono contenere sequenze di DNA simili a quelle del batterio *M. tuberculosis*, e alcuni di questi studi sono stati oggetto di ben motivato scetticismo (Gilbert *et al.* 2004).

Origini della domesticazione. La domesticazione degli animali e delle piante si è verificata in diverse regioni del mondo circa 10.000 anni fa. Ha coinvolto la selezione iniziale di determinate caratteristiche nelle popolazioni selvatiche ancestrali e la selezione continua di questi e altri tratti. I loci genetici variabili che non sono stati selezionati durante la domesticazione, come l'mtDNA, possono essere utilizzati per esaminare se molte diverse popolazioni selvatiche hanno contribuito al patrimonio genetico degli attuali animali, o se il processo di domesticazione è avvenuto in una sola regione. I geni selezionati durante la domesticazione possono essere identificati per la loro bassa variazione rispetto al progenitore selvatico. Una volta che tali geni sono stati identificati, uno può, in linea di principio, determinare il momento in cui i vari tratti sono stati selezionati analizzando le variazioni nei campioni antichi.

I bovini moderni che discendono tutti dall'antenato *Bos. primigenius* (uro) sono stati il risultato di un evento di domesticazione avvenuto nel periodo Neolitico nella Mezzaluna Fertile, a seguito del quale le mandrie hanno accompagnato l'uomo durante le sue migrazioni. Sebbene il Vicino Oriente sia riconosciuto come centro di domesticazione più probabile, l'ampia distribuzione geografica degli uri, mantiene aperto il dibattito sul possibile contributo delle popolazioni locali (ad esempio quelle europee) di *Bos. primigenius*, agli eventi di domesticazione. Nel 1996 Bailey e collaboratori effettuarono il primo studio sui due individui di *Bos. primigenius* ritrovati in Inghilterra. L'analisi della regione di controllo del DNA mitocondriale, ha dimostrato la presenza negli uri di un aplotipo denominato P, diverso per 8 mutazioni, dall'aplotipo T che si osserva nei bovini moderni. Negli anni successivi altri studi hanno confermato questi risultati. Nel 2001 Troy e collaboratori confrontarono una sequenza della regione di controllo del DNA mitocondriale di 392 animali moderni provenienti dall'Europa, dall'Africa e del Vicino Oriente, con la stessa di quattro animali antichi provenienti dall'Inghilterra. Nell'analisi filogenetica le sequenze "antiche" apparivano raggruppate in un unico cluster.

Edwards e collaboratori nel 2007 analizzarono 59 campioni di ossa appartenenti al *Bos. primigenius* risalenti al Mesolitico, al Neolitico e all'Età del Bronzo e provenienti da diverse regioni Europee. I risultati hanno rivelato la presenza dell'aplogruppo P nel nord e centro Europa.

L'assenza dell' aplogruppo P nelle moderne razze europee insieme alle analisi filogeografiche dell' aplogruppo T in Europa e nel Medio Oriente, suggerisce che il *Bos. taurus* d'Europa discende dai progenitori del Vicino Oriente.

Per quanto riguarda il mais, le ricerche archeologiche dimostrano che la domesticazione sia avvenuta in Messico da una pianta chiamata "teosinte" (Piperno *et al.* 2001). Recentemente sono stati clonati e caratterizzati alcuni geni selezionati durante il processo di domesticazione che sono coinvolti nell'architettura delle piante e nella produzione dell'amido (Wang *et al.* 1999, Whitt *et al.* 2002). Per ciascuno di questi geni, la diversità allelica del mais è ridotta rispetto a quella osservata nelle piante selvatiche, a causa della selezione da parte degli agricoltori. Quando gli stessi geni sono stati analizzati nel mais risalente a 4400 anni fa proveniente dal Messico, sono stati trovati gli alleli tipici del mais contemporaneo (Jaenicke-Despres *et al.* 2003). Così, i primi agricoltori selezionavano non solo i geni che modificano la struttura della pianta di mais, ma anche quelli che influenzano le proprietà biochimiche della pianta come la composizione dell' amido.

4.2. Obiettivo

L'analisi del DNA antico può essere un ottimo strumento per interpretare la struttura genetica di popolazioni di animali allevati in tempi storici, la loro origine geografica, la demografia. Inoltre lo studio dei genotipi ci permette di attribuire i resti di animali prelevati negli stessi siti di ritrovamento a specifici individui e di stabilire l'appartenenza alle popolazioni. Tuttavia i marcatori microsatelliti, pur essendo molto informativi e variabili, sono difficili da analizzare in quanto si trovano nel DNA nucleare che, in campioni antichi, è scarso e molto degradato. Inoltre le possibilità di contaminazioni con DNA esogeno quando si lavora con materiale antico è estremamente elevato, per cui si devono adottare molte precauzioni e utilizzare dei laboratori appositi.

In questo studio abbiamo selezionato dal database FAO 15 microsatelliti, per i quali sono stati ridisegnati, sulle sequenze di riferimento, primers specifici capaci di amplificare frammenti più corti di quelli originali. I loci sono stati analizzati su resti di ossa di bovini risalenti al medioevo prelevati da Ferento, un sito archeologico situato nell'Italia centrale. I dati ottenuti sui campioni antichi sono stati poi confrontati con quelli provenienti da razze moderne.

4.3. Materiali e metodi

4.3.1. Campionamento

Sono stati analizzati un totale di 13 campioni di ossa bovine provenienti da Ferento, un sito archeologico situato nel Lazio. Le ossa, risalenti all'epoca medioevale, sono state prelevate dal sito e portate nel nostro laboratorio dedicato alla sola analisi del DNA antico. Sono state prese tutte le precauzioni possibili per limitare il livello di contaminazione del materiale già in precedenza manipolato durante il recupero.

Sui reperti è stata eseguita una doppia estrazione di DNA da diverse tipologie di ossa. In tabella 8 sono mostrati i 13 campioni analizzati.

Tabella 8. Campioni medioevali analizzati.

Nome	Fase	Saggio	Elemento
M1	M	V	Astragalo
M2	M	III	Falange
M4	M	IV	Calcagno
M5	M	III	Molare
M6	M	IV	Falange
M7	M	IV	Astragalo
M8	M	IV	Astragalo Sx
M9	M	III	P4 Mand
Q7	M	IV	Falange 1
Q8	M	IV	Metatarso
Q9	M	III	Falange 2
Q10	M	V	Calcagno
Q11	M	II	Metatarso

4.3.2. Estrazione DNA

Il frammento osseo, prima del suo impiego nell'estrazione del DNA, deve essere pulito in modo da eliminare eventuali tracce di DNA eterologo dalla sua superficie. A tal fine è stato rimosso con carta abrasiva uno strato superficiale di circa 1 mm dal campione e, successivamente, la superficie del reperto è stata irradiata ortogonalmente per 45 min con raggi uv a 254 nm. Scopo di tale irradiazione è di rendere inattivo e, quindi, non contaminante l'eventuale DNA eterologo presente sul reperto osseo. Dopo queste operazioni è possibile procedere al recupero di un frammento per le successive fasi di analisi.

A questo punto si esegue un carotaggio con un trapano per prelevare la polvere dell'osso. Ogni esemplare è stato suddiviso in aliquote di 0,5 grammi e congelate a -20°C fino al momento dell'estrazione.

Sono stati testati tre diversi protocolli di estrazione al fine di individuare quello con la migliore resa. Il primo protocollo (Yang *et al.*1998) prevede una fase di lisi con un apposito tampone e la successiva purificazione del digerito con il Kit QIAGEN QIAquick PCR purification KIT. Il protocollo qiagen utilizza una procedura semplice che prevede l'uso di colonnine di silice in grado di trattenere per affinità la molecola di DNA. La successiva purificazione e eluizione vengono effettuate utilizzando gli appropriati buffer.

Le fasi dell'estrazione sono riportate di seguito

1. Nella fase di lisi per ogni 0.5 g di polvere d'osso si usa 2 ml di un tampone contenente :
 - EDTA 0,5M pH8
 - Detergente anionico (SDS)
 - Proteinasi K (100 ug/ml)
 - Tris-HCL 1 M pH 8

La digestione viene condotta overnight in agitazione.

2. Si centrifuga la soluzione di estrazione a 2,000g per 5 minuti,
3. Vengono aliquotati 1.25-mL del supernatante in eppendorf da 1.5-mL e si centrifuga a 14,000g per 5 minuti
4. Il supernatante viene trasferito in una falcon da 10-mL e vengono aggiunti 5 volumi di QIAquick PB buffer.

5. Vengono caricati 750 μ L di sopranatante nelle colonnine QIAquick (messe nei tubi da 2ml) e si centrifuga a 14,000g per 1 minuto
6. Il filtrato viene scartato e la colonnina messa nuovamente nello stesso tubo
7. Si ripete il processo fin quando il sopranatante finisce.
8. Vengono aggiunti 750 μ L di QIAquick PE buffer alle colonnine e si centrifuga a 14,000g per 1 minuto
9. Il filtrato viene scartato e la colonnina messa nuovamente nello stesso tubo
10. Gli steps 11-13 vengono ripetuti
11. Si trasferiscono le colonnine in tubi nuovi da 1.5ml
12. Il DNA viene eluito aggiungendo 30 μ L di EB buffer alle colonnine e centrifugando per 1 minuto alla massima velocità

La seconda prova di estrazione è stata effettuata seguendo il protocollo di Loreille e collaboratori (2007), che prevede la demineralizzazione totale dell'osso. Per dissolvere completamente la polvere delle ossa, la quantità di EDTA, contenuta nel buffer di estrazione, è stata aumentata a 9 ml invece di 2 ml usata nel protocollo precedente. Il buffer di lisi è costituito dai seguenti reagenti:

-EDTA 0,5 M

-1% Lauryl sarcosinate

-200ul Proteinase K

Tutte le successive fasi di estrazioni sono identiche a quelle del protocollo precedente.

L'ultimo Kit testato è quello della ditta Invitrogen: ChargeSwitch Technology. La tecnica, utilizzata soprattutto in ambito forense, si basa su un semplice meccanismo di scambio ionico che utilizza un ligando caricato positivamente a pH basso, e neutro a pH 8.5 per legare ed eluire il DNA. Per ogni 0,5 grammi di polvere di osso vengono riportate le diverse fasi

1. Ogni campione viene incubato a 55°C per un'ora in un tubino contenente 1 ml di Lysis buffer (**L13**) e 10ul di proteinase K **PK** (fornita)
2. Il supernatante viene trasferito in un nuovo tubo

3. Vengono aggiunti 200ul di Buffere **N5** al campione e il tutto viene mescolato
4. Si aggiungono 20ul di ChargeSwitch Magnetic Beads e si lascia incubare a temperatura ambiente per 1-5 min
5. I tubini contenenti i campioni vengono messi nel **Rack magnetico** per 1 minuto
6. Senza togliere il campione dal rack magnetico si rimuove il supernatante
7. Vengono rimossi dal Rack magnetico i tubini contenenti il pellet
8. Vengono aggiunti 500ul di ChargeSwitch Wash Buffer (W12)
9. I campioni vengono messi nel **Rack magnetico** per 1 minuto e senza togliere il campione dal rack magnetico viene rimosso il supernatante
10. Il DNA viene eluito attraverso il buffer di eluizione

La quantificazione del DNA si è eseguita con il Picogreen (Invitrogen) utilizzando il DTX Multimode Detector (Beckman).

4.3.3. Scelta dei microsatelliti

I microsatelliti si trovano nel DNA nucleare, che come abbiamo già sottolineato, nei campioni antichi è scarso e altamente degradato. Per poter ottenere dei prodotti di PCR, quindi, è indispensabile scegliere dei primers che amplificano frammenti non più lunghi di 150bp.

I loci sono stati scelti dal pannello FAO, che indica 30 microsatelliti da utilizzare come marcatori molecolari per lo studio della biodiversità delle specie bovine. Tuttavia tra questi 30 loci soltanto tre avevano una grandezza inferiore a 150bp. Per poter analizzare anche gli altri, sono stati disegnati, sulla sequenza dei rimanenti loci, primers specifici capaci di amplificare frammenti più corti di quelli originali. In uno studio precedente condotto nel nostro laboratorio, infatti, sono stati sequenziati i 30 microsatelliti della lista FAO su tre animali di riferimento. Sulle sequenze ottenute sono stati disegnati i primers utilizzando il programma Polyprimers. In totale sono stati testati 15 microsatelliti sui resti bovini (tabella 9)

4.3.4. PCR

Nel caso dello studio del DNA antico è necessario effettuare due cicli di amplificazione successivi per ottenere un prodotto soddisfacente. Tale metodologia si effettua prendendo come campione di DNA da amplificare il prodotto amplificato ottenuto dalla prima PCR; la successiva amplificazione ha le stesse condizioni della precedente.

Tabella 9. Marcatori microsatelliti testati sui bovini antichi. Per ogni locus è indicato il cromosoma bovino di appartenenza, la grandezza degli alleli originali, la grandezza degli alleli ottenuti con i nuovi primers e la temperatura di annealing. In grigio sono evidenziati i loci amplificati con i primers originali

Locus	BTA	Grandezza alleli originali	Grandezza alleli nuovi	Temp. Annealing
CSSM66	14	183	100	64
ETH10	5	218	90	63
ETH152	5	199	111	63
ETH185	5	227	98	60
ETH225	9	158	96	61
HEL13	11	198	90	52
HEL9	8	149	90	61
ILSTS005	10	184	90	60
ILSTS006	7	290	104	63
INRA063	18	177	116	60
SPS115	15	247	118	59
HEL1	15	104	104	55
CSRM60	10	99	99	61
INRA005	12	139	139	55

BTA: Cromosoma Bovino

La prima reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 20ul contenente 10ng di DNA stampo e 18ul di miscela di reazione costituita da: 1x buffer, 2.5mM MgCl₂, 200uM dNTPs, 0.05uM di ciascun primer marcato (Proligo), 0.2 unità di Taq Polimerasi (Bio-x-act short Bioline). La Taq Bio-x-act è specifica per l'amplificazione di frammenti corti.

La reazione di amplificazione consiste nel seguente programma PCR:

- | | | |
|-----------------------------|---|-----------------|
| 7. 95°C per 5 minuti | | |
| 8. 95°C per 30 secondi | } | 30 cicli |
| 9. Annealing per 30 secondi | | |
| 10. 72°C per 1 minuto | | |
| 11. 72°C per 5 minuti | | |
| 12. 4°C | | |

La reazione di amplificazione selettiva avviene utilizzando un programma di PCR *touch down*, partendo da una temperatura di appaiamento di 7°C superiore alla temperatura di denaturazione dei primer. Nei passaggi successivi questa temperatura viene progressivamente ridotta fino a portare la temperatura di *annealing* a quella specifica per il completamento della reazione.

I frammenti amplificati sono stati purificati mediante ExoSap-IT (USB Corporation), per rimuovere i primers e i dNTPs residui. L'ExoSap, infatti, è composto da due enzimi idrolitici: l'Esonucleasi I che degrada i primers a singolo filamento ed altri singoli filamenti prodotti dalla PCR, la SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) che defosforila i dNTPs residui. Il protocollo di purificazione è il seguente:

1. Unire 1 ul di ExoSap-IT a 2,5ul di reazione PCR.
2. Incubare a 37°C per 15 minuti
3. Incubare a 80°C per 15 minuti per inattivare gli enzimi.

Il prodotto purificato viene utilizzato come template per il secondo ciclo di PCR che ha le stesse condizioni del primo.

4.3.5. Elettroforesi capillare e visualizzazione dei prodotti di PCR

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante l'elettroforesi capillare utilizzando il sequenziatore CEQ Beckman. Il campione da caricare viene preparato nelle apposite piastre fornite dalla Beckman in un volume totale di 40ul contenente

38.7ul SLS

0.3ul standard400 (CEQ 400)

1ul prodotto di PCR

Lo standard di peso molecolare noto, è formato da un insieme di frammenti di dimensione conosciuta (compresa tra 50 e 500 bp) marcati con un fluoroforo diverso da quello utilizzato per marcare i primers. Per ogni campione è stato possibile separare i frammenti amplificati per colore del fluoroforo e dimensionare gli alleli di ogni *locus* microsatellite. Il dimensionamento dei singoli alleli avviene per confronto con lo *standard* interno.

L'analisi dei frammenti è stata eseguita attraverso la **binning analysis** che ha permesso di esaminare i profili dei microsatelliti per ogni marcatore fluoroforo;

Per "binning" o formazione di bin s'intende il raggruppamento monodimensionale, in base alle dimensioni, di frammenti compilati da campioni multipli. L'analisi dei bin ottenuti permette di generare un elenco di alleli rappresentativo della popolazione oggetto dello studio. Quando vengono condotte analisi dei bin, il sistema raggruppa i frammenti in base alle loro dimensioni, in modo da formare "bin" caratterizzati da dimensioni medie e da una deviazione standard dei frammenti compresi nel bin. L'analisi di ogni picco allelico e il suo dimensionamento in paia di basi hanno permesso di ricavare il genotipo per ogni individuo.

4.3.6. Autenticazione del DNA

Al fine di autenticare i risultati ottenuti, sono state prese tutte le precauzioni per limitare le contaminazioni durante le diverse fasi dello studio. In primo luogo le analisi sono state effettuate in un laboratorio apposito per il DNA antico. Tale laboratorio è costituito da una zona di preamplificazione dove vengono conservati i reperti e dove si effettua l'estrazione del DNA, e da una zona di amplificazione dove si esegue esclusivamente la reazione di PCR. Sia l'estrazione che l'amplificazione sono state allestite sotto cappe dotate di raggi uv a 254 nm messi in funzione per circa 30 minuti prima della fase sperimentale. Gli operatori, inoltre, hanno sempre indossato camici, guanti, mascherine e cuffie per minimizzare la contaminazione.

Sui reperti è stata eseguita una doppia estrazione di DNA, e per ognuna sono state effettuate due reazioni di PCR. Questo ha permesso di individuare contaminazioni che sono avvenute in una particolare estrazione o amplificazione.

Infine tutte le PCR e le estrazioni contenevano controlli negativi per poter individuare eventuali contaminazioni.

4.3.7. Database dei bovini moderni

Per iniziativa della FAO, è stato delineato un programma di intervento a tutela della biodiversità bovina. Durante il convegno ISAG, tenutosi in Francia nel 1996, sono stati indicati 30 microsatelliti da utilizzare come marcatori molecolari. La scelta dei microsatelliti è stata fatta in base ai seguenti criteri:

- Esistenza di una popolazione di riferimento già esistente
- Interpretazione dei microsatelliti
- Numero degli alleli
- Possibilità di analisi con sequenziatore automatico
- Possibilità di amplificare più microsatelliti in una singola reazione

Diversi sono stati i progetti finanziati dalla Comunità Europea per lo studio della biodiversità bovina, tra cui quello che ha visto coinvolto il nostro laboratorio e in cui sono stati genotipizzati con i 30 microsatelliti FAO 50 animali di 72 razze bovine di cui 5 provenienti dall'Africa e le altre appartenenti a diversi paesi Europei tra cui la Francia, l'Italia, la Spagna, la Svizzera, il Belgio e l'Inghilterra (Tabella 10).

Il database creato durante questo progetto è stato usato per il confronto con i bovini antichi. In particolare dal database sono stati selezionati tutti i micro che hanno dato amplificazioni positive nei campioni antichi.

4.3.8. PCR bovini moderni

Per poter confrontare le lunghezze degli alleli ottenuti per i bovini antichi con quelle dei bovini moderni del database, abbiamo incluso nelle reazioni di PCR anche tre campioni moderni (ITROM10, ITROM11, ITROM20) come riferimento, facenti parte del database. In seguito gli alleli dei bovini antichi sono stati ricalcolati per confronto con gli individui di riferimento. Le condizioni di PCR per i campioni moderni sono state le stesse di quelle utilizzate per i campioni antichi. I risultati ottenuti dalle PCR dei campioni antichi e di quelli moderni sono stati confrontati con le lunghezze alleliche trovate nel database di riferimento. Sono state analizzate le divergenze tra le letture degli alleli e sono stati uniformati i risultati al fine di poter confrontare i bovini antichi con quelli moderni presenti nel database.

Tabella 10. Database dei bovini moderni. Sono indicati i codici, il paese di provenienza e le razze di appartenenza dei campioni

Code	Country	Breed
AFBOR	Africa	Borgou
AFLAG	Africa	Lagunaire
AFNDA	Africa	N'Dama
AFSOM	Africa	Somba
AFZEB	Africa	Zebu
BEBWB	Belgium	Belgian Blue
CHERI	Swiss	Eringier
CHEVO	Swiss	Evolene
CHHFR	Swiss	Holstein Berne
CHSIM	Swiss	Simmental
CHSWB	Swiss	Swiss Brown
CRIST	Croatia	Istrian
CZBOR	Tchechie	Bohemian Red
DEANG	Germany	Angeln
DEBPW	Germany	German Original Black Pied-West
DEBRG	Germany	German Brown Bavaria, Wuerttemberg
DEBRO	Germany	German Brown Original
DEHIW	Germany	Hinterwaelder
DERH2	Germany	Red Holstein dual purpose
DERHD	Germany	Red Holstein dairy type
DESIM	Germany	German Simmental
DEYEL	Germany	German Yellow
DKDAR	Denmark	Danish Red
DKJUT	Denmark	Jutland 1950
ESALS	Spain	Alistano-Sanabressa
ESASM	Spain	Asturiana de la Montana
ESASV	Spain	Asturiana de los Valles
ESAVI	Spain	Avilena Negro Iberica
ESBEB	Spain	Betizu locations 2, 3
ESBPI	Spain	Bruna de los Pirineds
ESCNA	Spain	Casta Navarra
ESMON	Spain	Monchina
ESMOR	Spain	Morucha
ESPIRM	Spain	Pirenaica
ESRET	Spain	Retinta
ESRGA	Spain	Rubia Gallega

ESSAY	Spain	Sayaguesa
ESSTE	Spain	Serrana de Teruel
ESTUD	Spain	Tudanca
FRAUB	France	Aubrac
FRBAZ	France	Bazadais
FRBDA	France	Blonde d'Aquitaine
FRBPN	France	Bretonne-Pie-Noire
FRCHA	France	Charolais
FRGAS	France	Gasconne
FRLIM	France	Limousin
FRMAN	France	Maine-Anjou
FRMBE	France	Montbéliard
FRNOR	France	Normand
FRSAL	France	Salers
GBABA	Great-Britain	Aberdeen Angus
GBAYR	Great-Britain	Ayrshire
GBDEX	Great-Britain	Dexter
GBGUE	Great-Britain	Guernsey
GBHER	Great-Britain	Hereford
GBHFR	Great-Britain	Friesian
GBJER	Great-Britain	Jersey
GBSHI	Great-Britain	Highland
ITCAB	Italy	Cabannina
ITCHI	Italy	Chianina
ITGRA	Italy	Grigia Alpina
ITPIM	Italy	Piemontese
ITPOD	Italy	Podolica
ITPRI	Italy	Pezzata Rossa Italiana
ITREN	Italy	Rendena
ITROM	Italy	Romagnola
NLDUB	Netherlands	Dutch Belted
NLFRH	Netherlands	Fries Hollands
NLGWH	Netherlands	Groningen Whiteheaded
NLMRY	Netherlands	MRY
POPOR	Poland	Polish Red
SWSRP	Sweden	Swedish Red Polled

4.3.9. Analisi statistiche

I microsatelliti che hanno dato amplificazioni positive nei campioni antichi sono stati utilizzati per le analisi statistiche. Sono stati calcolati gli indici di diversità genetica e attraverso l'analisi Bayesiana e della PCA i bovini antichi sono stati paragonati a quelli del database moderno. Abbiamo utilizzato i programmi GENALEX, GENEPOP e PCAGEN

4.3.9.1. Indici di diversità genetica

Sono stati utilizzati i seguenti parametri di variabilità genetica:

- 1) L'eterozigosi attesa (Hetexp) in una popolazione, dove avvengono accoppiamenti casuali, è stata calcolata secondo Nei attraverso il software powermarker. Se ci sono i differenti alleli e p_i è la frequenza dell'allele i -esimo allora

$$H_s = 2 \sum_{i,j} p_i p_j = 1 - \sum_i p_i^2$$

- 2) Numero medio di alleli per popolazione.

4.3.9.2. Equilibrio di Hardy-Weinberg

Per rilevare possibili deviazioni dall'equilibrio di HW dovute ad un eccesso o deficit di eterozigoti è stato usato il programma GENEPOP. Quest'ultimo usa come parametro l'indice F_{is} per descrivere il deficit di eterozigoti dovuto ad accoppiamenti non casuali tra individui in una sottopopolazione. La significatività è stata testata tramite catene di Markov, usando 1000 permutazioni e 1000 *batch* per permutazione e riportando la percentuale di valori maggiori rispetto a quelli osservati.

4.3.9.3. Likelihood

L'analisi di likelihood consente di assegnare un soggetto ad una razza attraverso un approccio probabilistico. L'individuo da assegnare viene analizzato con i marcatori microsatelliti e l'attribuzione viene effettuata in maniera probabilistica, partendo dalle frequenze alleliche di ciascuna razza. L'analisi prevede essenzialmente tre passaggi: i) calcolo delle frequenze alleliche in tutte le popolazioni candidate; ii) calcolo della funzione di verosimiglianza di ogni genotipo multilocus all'interno delle popolazioni di riferimento iii) assegnazione dell'individuo alla

popolazione in cui la funzione di verosimiglianza del suo genotipo è massima. In questo studio abbiamo usato l'analisi di massima verosimiglianza per assegnare gli individui di Ferento alle razze dei bovini moderni. attraverso il programma GENALEX.

4.3.9.4. Analisi delle componenti principali (PCA)

L'analisi delle componenti principali è stata effettuata con il programma PCAGEN. Questo programma, in base ai valori delle frequenze alleliche è in grado di fornire una rappresentazione grafica a due dimensioni in cui si possono visualizzare le componenti principali della variabilità genetica.

4.4. Risultati

4.4.1. Resa di estrazione del DNA

Per scegliere il protocollo di estrazione con la migliore resa, sono stati testati tre diversi Kit su un campione di prova. La lettura delle concentrazioni dei prodotti di estrazione attraverso il picogreen ha rivelato che il protocollo che prevede l'uso del kit qiagen è quello con la migliore resa. Come si può osservare dalla tabella 11, le concentrazioni espresse in ng/1 grammo di polvere di osso variano da 28 per il protocollo invitrogen a 2565 per quello di Yang *et al.* 1998.

Tabella 11. Resa di estrazione di DNA espressa in ng/g di polvere di osso per i tre protocolli testati.

	Invitrogen	Loreille <i>et.al</i> 2007	Yang <i>et.</i> <i>al</i> 1998
Campione	18	1428	2565
bianco	-0,07	-0,19	-0,22

Per le successive analisi, quindi, si è scelto di utilizzare il protocollo di Yang e collaboratori (1998). Ogni campione è stato estratto due volte e in tutte le estrazioni sono stati sempre inclusi i controlli negativi. Il primo importante risultato è stato di aver estratto il DNA da tutti i campioni testati. In tabella 12 è mostrata, per ogni campione, la resa delle due estrazioni di DNA espressa in ng/grammi di polvere d'osso. Il campione M9 ha la resa minore con 450 ng per grammo di polvere, mentre M5 ha la resa maggiore (9300ng/g polvere d'osso). Inoltre si può notare che le seconde estrazioni presentano sempre una resa minore rispetto alle prime. Per quanto riguarda l'autenticazione dei risultati, tutti i bianchi di estrazione nella lettura del picogreen sono risultati negativi, indicando l'assenza di contaminazioni.

Tabella 12. Resa di ciascuna estrazione del DNA per ogni campione espressa in ng di DNA per grammo di polvere di osso

Campione	1°estrazione	2°estrazione
M1	3900	900
M2	4800	2400
M4	1950	800
M5	9300	500
M6	4800	800
M7	900	400
M8	1860	960
M9	450	230
Q7	3000	2000
Q8	4500	3000
Q9	6000	2000
Q10	2000	1000
Q11	1200	800

4.4.2. Tassi di amplificazione

Ogni campione di ciascuna estrazione è stato amplificato almeno due volte per tutti i loci. Per valutare la possibilità di contaminazioni con DNA esogeno, sono stati inclusi nelle reazioni numerosi bianchi che sono risultati sempre negativi. In media sono state effettuate circa 41 PCR per locus per un totale di 600 reazioni. Dei 15 microsatelliti testati cinque hanno amplificato con successo in almeno un campione. In tabella 13 sono mostrati i risultati delle reazioni di PCR per ogni campione e per ogni locus. La percentuale di amplificazioni positive è stata calcolata per ogni campione e per ogni locus attraverso il rapporto tra il numero di PCR con esito positivo e il numero di amplificazioni totali. Come indicato in tabella 14, il locus CSRM60 mostra il più alto numero di amplificazioni avvenute con successo (26%) mentre il locus HEL13 hanno il tasso più basso di amplificazione (2%). Tra i campioni M5 risulta avere il maggior tasso di amplificazione.

Tabella 13. Grandezze alleliche espresse in paia di basi di ogni campione per ciascuno dei 5 microsatelliti che hanno amplificato con successo.

	INRA005	HEL1	ETH10	HEL13	CSRM60
M1	n.a	n.a	n.a	n.a	103/103
M2	141/141	105/105	92/92	131	105/105
M4	143/143	n.a	92/92	n.a	93/93
M5	143/145	103/111	92/92	129	99/103
M6	139/139	n.a	92/92	n.a	103/103
M7	141/141	105/111	92/92	n.a	103/103
M8	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
M9	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Q7	n.a	n.a	92/92	n.a	103/103
Q8	139/139	111/111	92/92	n.a	99/99
Q9	n.a	111/111	88/96	n.a	93/103
Q10	n.a	103/103	n.a	n.a	101/101
Q11	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a

n.a: non amplificabile

Tabella 14. Numero di PCR e tasso di amplificazione per ogni campione e per ogni locus

Code	CSRM60		HEL1		INRA005		HEL13		ETH10	
	n.PCR	%pPCR positive	n.PCR	%PCR positive	n.PCR	%PCR positive	n.PCR	% PCR positive	n.PCR	%PCR positive
M1	6	0,17	4	0,0	5	0,0	4	0,0	4	0
M2	6	0,67	4	0,25	5	0,4	4	0,0	4	0,5
M4	6	0,17	4	0,0	5	0,2	4	0,0	4	0,5
M5	6	0,50	4	1,0	5	0,4	4	0,25	4	0,5
M6	6	0,17	2	0,0	4	0,25	4	0,0	4	0,5
M7	6	0,17	2	0,5	4	0,25	4	0,0	4	0,25
M8	6	0,00	2	0,0	4	0,0	4	0,0	4	0,0
M9	6	0,00	2	0,0	4	0,0	4	0,0	4	0,0
Q7	9	0,33	5	0,0	4	0,0	4	0,0	4	0,25
Q8	9	0,11	5	0,2	4	0,25	4	0,0	4	0,25
Q9	6	0,50	5	0,6	2	0,0	4	0,0	4	0,25
Q10	5	0,60	4	0,5	2	0,0	4	0,0	4	0,0
Q11	8	0,00	5	0,0	3	0,0	4	0,0	4	0,0
TOT	85	0,26	48	0,23	51	0,13	52	0,02	52	0,23

4.4.3. Analisi statistiche

Nelle analisi statistiche sono stati considerati sia i dati dei campioni antichi che quelli dei bovini moderni per i cinque loci selezionati.

4.4.4. Indici di diversità genetica

Per ogni popolazione sono stati calcolati i valori di eterozigosi attesa e osservata e il numero medio di alleli. Ferento mostra un valore di eterozigosi osservata pari a 0.16 che è il più basso rispetto alle popolazioni moderne e un valore di eterozigosi attesa di 0.61.

Il numero medio di alleli per popolazione varia da 3.33 per la razza Dexter (sigla GBDEX) e Ferento e 7 per la razza podolica italiana (sigla ITPOD). Inoltre nella popolazione antica il locus più polimorfico risulta essere CSRM60 con un numero di alleli pari a 5, mentre quello meno polimorfico è Hel 13 con 2 alleli.

4.4.5. Equilibrio di Hardy- Weinberg

Per rilevare possibili deviazioni dall'equilibrio di HW ossia l'eventuale presenza di un eccesso o deficit di eterozigoti è stato utilizzato come parametro l'indice F_{IS} . Nel nostro studio la popolazione di Ferento ha mostrato deviazioni significative dall'equilibrio ($P < 0.05$) per tre (ETH10, CSRM60 e INRA005) dei cinque loci analizzati dovuto a un deficit di eterozigoti.

4.4.6. Likelihood

Al fine di confrontare i dati dei bovini antichi con quelli moderni, è stata effettuata l'analisi likelihood. Ogni individuo della popolazione di Ferento è stato assegnato a una delle razze del database di riferimento in base alla funzione di massima verosimiglianza. I risultati sono mostrati in tabella 16. L'individuo M1 è assegnato alla razza Francese Bazadais, M2 ed M6 a due razze Inglesi (Aberdeen Angus e Hereford) M4 e M5 a due razze Tedesche (Angeln e Red Holstein), M7 alla razza svedese Swedish Red Polled, Q7 alla razza Spagnola Tudanca (sigla ESTUD), Q8 alla Olandese Dutch Belted e Q9 e Q10 a due razze Italiane (Romagnola e Chinina). In tabella 16, inoltre, sono riportate tra parentesi, le razze con la seconda migliore likelihood. Si nota che tra queste molte appartengono a razze italiane (ITCAB, ITCHI, ITROM, ITREN).

Tabella 15. Valori di eterozigosi attesa H_e e osservata H_o , numero di campioni N_c e numero medio di alleli N_a per ciascuna popolazione

Popolazione	N_c	H_e	H_o	N_a
GBHER	48	0,6145	0,5753	4,60
GBAYR	48	0,6560	0,6305	5,00
GBHFR	50	0,6584	0,6541	5,60
GBABA	50	0,5649	0,5496	4,20
GBJER	47	0,5456	0,5323	4,20
GBSHI	45	0,4986	0,5075	3,80
GBDEX	46	0,5986	0,6395	4,00
GBGUE	64	0,5789	0,5682	4,40
CRIST	45	0,6956	0,6678	5,80
CZBOR	25	0,6784	0,6976	5,00
DKDAR	36	0,5923	0,6444	3,40
DKJUT	44	0,6443	0,6133	4,80
FRAUB	50	0,5561	0,5470	5,60
FRSAL	50	0,5274	0,4903	5,20
FRBAZ	47	0,5860	0,6304	4,00
FRBPN	31	0,6138	0,6223	4,40
FRLIM	50	0,6484	0,6062	5,00
FRCHA	55	0,5317	0,5477	4,20
FRMAN	49	0,5029	0,5426	4,60
FRMBE	30	0,5958	0,5675	3,80
FRNOR	50	0,6259	0,6237	6,60
FRGAS	50	0,6937	0,6448	5,80
FRBDA	61	0,6254	0,6079	5,00
ITCAB	26	0,6581	0,5260	4,80
ITCHI	36	0,6913	0,6450	4,80
ITPIM	48	0,6793	0,6846	5,20
ITPRI	49	0,6002	0,6616	4,00
ITROM	32	0,6470	0,6118	5,40
NLDUB	24	0,6253	0,6225	4,60
NLFRH	34	0,5823	0,5275	4,60
NLGWH	25	0,4930	0,4590	3,60
NLMRY	39	0,6626	0,7016	4,20
POPOR	48	0,6998	0,7167	5,60
SWSRP	32	0,5944	0,5500	4,80
BEBWB	50	0,6441	0,6333	5,40
DESIM	50	0,6177	0,6440	4,20
DEBRO	25	0,6361	0,6223	4,80
DERH	50	0,6769	0,7440	5,00
DERHD	50	0,6510	0,6508	4,60
DEBRG	50	0,6995	0,7418	5,20

Popolazione	N.c	He	Ho	N.a
DEBPW	20	0,6467	0,6768	5,00
DEYEL	50	0,6206	0,6013	4,60
DEHIW	30	0,6100	0,6148	4,60
DEANG	50	0,6720	0,7230	5,40
CHSIM	50	0,5413	0,5480	4,20
CHERI	50	0,6179	0,6280	4,40
CHEVO	15	0,6271	0,6133	3,40
CHSWB	50	0,6558	0,5960	4,60
CHHFR	50	0,6514	0,6400	5,20
ITGRA	28	0,5781	0,5685	4,60
ITREN	34	0,6076	0,5518	4,20
ITPOD	50	0,7468	0,7197	7,00
ESCNA	50	0,6814	0,6301	5,40
ESBEB	23	0,6840	0,6689	4,60
ESALS	50	0,6672	0,6560	5,20
ESSAY	48	0,6704	0,6458	4,60
ESTUD	50	0,5665	0,5960	5,00
ESASV	50	0,6667	0,6640	5,40
ESASM	50	0,6632	0,6400	4,80
ESRET	50	0,6218	0,5826	5,40
ESMOR	50	0,6779	0,6760	5,20
ESAVI	50	0,6846	0,6400	5,20
ESPIRM	50	0,6215	0,5920	5,00
ESBPI	50	0,6891	0,6600	5,80
ESRGA	50	0,6298	0,6360	4,60
ESMON	59	0,6588	0,6311	5,80
ESSTE	44	0,6778	0,7289	4,60
AFNDA	30	0,5968	0,4533	5,80
AFSOM	50	0,5436	0,4786	5,80
AFLAG	51	0,5052	0,4692	4,80
AFZEB	50	0,6072	0,6016	6,20
AFBOR	50	0,6770	0,6384	6,60
Ferento	13	0,6168	0,1650	3,40

Tabella 16. Assegnazione di ciascun campione di Ferento a una delle razze del database di riferimento in base alla funzione di massima verosimiglianza

Campione Ferento	Sigla razze moderne
M1	FRBAZ (ITCAB)*
M2	GBABA(FRSAL)
M4	DEANG (DKDAR)
M5	DERHD (CZBOR)
M6	GBHER (ITCHI) *
M7	SWSRP (ITROM)
Q7	ESTUD (SWSRP)*
Q8	NLDUB (ITCAB)
Q9	ITROM (ITREN)
Q10	ITCHI (DKJUT)

I campioni con * sono stati analizzati con meno di

3 microsatelliti. In parentesi è riportata la razza con

la seconda migliore likelihood.

4.4.7. PCA

I risultati della PCA sono mostrati in figura 12. L'analisi della prima componente principale spiega il 25.81% della varianza totale, mentre la seconda il 14.86%. Per la popolazione di Ferento sono mostrati tutti gli individui, mentre le razze moderne sono rappresentate unitariamente. Si osserva che alcuni individui la popolazione di Ferento si raggruppano con le razze Europee spagnole, inglesi, svedesi e francesi (ESTUD, GBHSH, SWSRP, la FRBAZ), mentre altri (Ferento1, Ferento2, Ferento5, Ferento10) risultano essere più vicini alle razze italiane come la Cabannina (ITCAB), la Romagnola (ITROM), la Rendena (ITREN), la Grigio Alpina (ITGRA) e la Podolica (ITPOD).

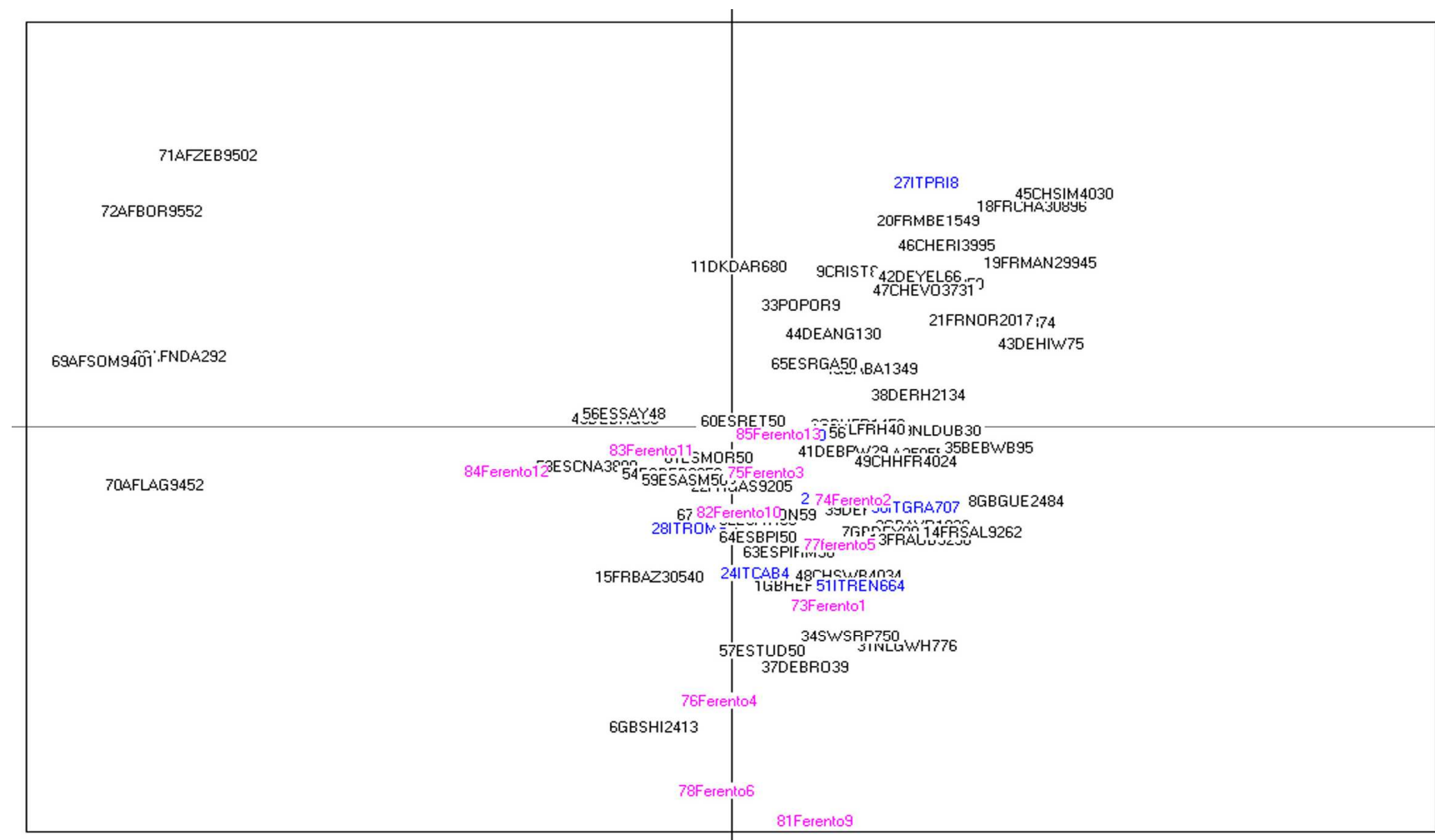


Figura 12. Analisi delle Componenti Principali. Asse1= 25,81%, Asse2=14,86%. In rosa sono evidenziati gli individui di Ferento, in blu le razze italiane

4.5. Discussione

Questo studio condotto sul DNA antico è stato svolto in collaborazione con la Professoressa De Minicis del Dipartimento di Scienze del Mondo Antico della Facoltà di beni culturali di Viterbo. In particolare sono stati analizzati 13 reperti ossei bovini risalenti al medioevo e provenienti da Ferento. Il sito di Ferento, situato sulla collina di Pianicara (Viterbo), ha una lunga vita documentata sia da fonti scritte che da monumenti romani e medievali. L'obiettivo di questo lavoro è stato di analizzare, attraverso i marcatori microsatelliti, i genotipi dei reperti bovini per un duplice scopo: i) confrontarli con quelli di razze moderne; ii) attribuire i resti di animali, prelevati negli stessi siti di ritrovamento, a specifici individui. Negli studi molecolari riguardanti campioni antichi, il DNA disponibile per la tipizzazione genetica è spesso molto scarso e degradato. Per questo motivo è indispensabile autenticare i risultati ottenuti. A tal fine, sono state prese tutte le precauzioni per evitare la contaminazione dei campioni: le analisi sono state condotte in un laboratorio apposito, sia negli esperimenti di estrazione del DNA, sia nelle reazioni di PCR sono stati sempre inclusi numerosi bianchi. Il primo importante risultato ottenuto è stato quello di estrarre il DNA da tutti i campioni presi in esame con una resa che varia da 450 ng/g a 9300ng/g di polvere d'osso. Tra i protocolli testati quello di Yang *et al* (1998) ha dato la migliore resa. Abbiamo osservato inoltre che le seconde estrazioni hanno sempre una resa più bassa. Probabilmente questo può essere dovuto al fatto che, a differenza delle prime estrazioni che vengono effettuate subito dopo i carotaggi, per le seconde la polvere di osso viene conservata fino al momento dell'estrazione. Anche se la conservazione avviene in falcon sigillate e a basse temperature, potrebbe avvenire una ulteriore degradazione del DNA.

Per quanto concerne le PCR abbiamo ottenuto dei risultati positivi per 5 dei 15 microsatelliti testati, con un tasso di amplificazione che va dal 2 al 26 %. Il rilievo di tale risultato ben si comprende se si pensa che oggi la maggior parte degli studi sul DNA antico è effettuata mediante l'analisi dell'mtDNA che, essendo meno degradato del DNA nucleare, è più facile da analizzare.

I tassi di amplificazione da noi ottenuti risultano essere più bassi rispetto a quelli trovati in uno studio simile (Edwards *et al.* 2003) condotto su resti bovini risalenti all'epoca dei Vichinghi. Questa differenza è dovuta probabilmente alla migliore conservazione di quest'ultimi campioni rinvenuti nel permafrost. I campioni analizzati nel nostro studio, invece, provenendo da un sito dell'Italia centrale, in cui le temperature sono miti, avranno subito un maggior processo di degradazione. Tutti i risultati sono stati autenticati dall'assenza di contaminazioni con DNA esogeno come hanno dimostrato i controlli negativi delle estrazioni e delle PCR.

Lo studio dei genotipi ci indica che molto probabilmente i resti analizzati appartengono ad individui diversi. Nessun campione, infatti, mostra uno stesso profilo allelico per ciascun locus microsatellite. Questo risultato è indispensabile nelle analisi degli archeologi, nel momento in cui devono attribuire i resti di animali, prelevati negli stessi siti di ritrovamento, a specifici individui.

Un altro importante risultato è stato di aver confrontato i dati microsatelliti ottenuti da questo studio con quelli riguardanti 72 razze bovine moderne.

Un ostacolo nell'uso dei microsatelliti è rappresentato dall'impossibilità di confrontare le grandezze alleliche dei loci amplificati in laboratori diversi. In questo studio è stato possibile effettuare il confronto con il database di riferimento attraverso l'amplificazione di alcuni animali moderni facenti parte di tale database.

La popolazione di Ferento ha un ridotto livello di variabilità rispetto alle razze moderne, come dimostrano i valori di eterozigosi e il numero medio di alleli. Il test di Hardy-Weinberg, ha rivelato per Ferento la presenza di disequilibrio per tre dei cinque loci testati dovuto ad un deficit di eterozigoti.

Il sorprendente livello di omozigosi riscontrato nei campioni di bovini antichi potrebbe essere dovuto ad incrocio stretto tra individui parenti. Ciò è rappresentativo di una condizione nella quale gli scambi di bestiame erano molto ridotti, come pure la numerosità della popolazione destinata alla riproduzione. In alternativa si potrebbe pensare ad un inbreeding voluto per mantenere specifiche caratteristiche di animali arrivati nel luogo per cause accidentali (es. al seguito di eserciti invasori). La seconda ipotesi potrebbe essere suggerita anche dall'alta likelihood che alcuni resti hanno di appartenere a razze "esotiche" tedesche, spagnole, svedesi, olandesi e addirittura inglesi. Inoltre l'analisi delle componenti principali sembra in parte confermare tali risultati mostrando alcuni individui di Ferento vicini a queste razze straniere. Ragionando sempre in termini di somiglianza, tuttavia, i valori della seconda migliore likelihood e la stessa PCA mostrano, altresì, la probabile vicinanza degli individui di Ferento alle razze italiane quali la Chinina e la Cabannina dell'Italia centrale, la qual cosa suggerirebbe l'origine antica di queste ultime, come peraltro dimostrato da Pellecchia e collaboratori nel 2007.

Questi rappresentano dati preliminari e il passo successivo sarà quello di aumentare il numero di campioni antichi e il numero di loci amplificati.

L'analisi dei marcatori microsatelliti in resti di animali allevati in tempi storici è in grado di fornire informazioni riguardanti la variazione genetica autosomica, consentendo, quindi, di indagare questioni più generali rispetto agli studi che utilizzano solo il DNA mitocondriale. Per piccole

popolazioni, i marcatori microsatelliti permettono un maggiore livello di analisi strutturale a causa del più elevato polimorfismo rispetto al mtDNA. I risultati positivi ottenuti dimostrano la possibilità di utilizzare i microsatelliti per lo studio dei bovini antichi e di confrontare, i genotipi degli animali allevati in tempi storici con quelli moderni presenti nelle banche dati.

Bibliografia

Ajmone-Marsan P., Valentini A., Cassandro M., Vecchiotti Antaldi G., Bretoni G. and Kuiper M. AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics* 1997, Vol. 28:418-426;

Bachtrog D., Agis M., Imhof M. and Schlötterer C. Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs-evidence from *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 2000, Vol.17:1277-1285;

Bailey J.F., Richards M.B., Macauley V.A., Colson I.B., James I.T., Bradley D.G., Hedges R.E. and Sykes B.C. Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species. *Proceedings of the Royal Society of London B* 1996, Vol.263: 1467-1473;

Baker J.S.F., Moore S.S., Hetzel D.J.S., Evans D., Tan S.G. and Byrne K. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Animal Genetics* 1997a, Vol.28:103–115,

Barnes, I., Matheus, P., Shapiro, B., Jensen, D. and Cooper, A. Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. *Science* 2002, Vol.295:2267–2270;

Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L. and Bonhomme, F. GENETIX, Version 4.05.2, 2004; logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. <http://www.univmontp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>. Ststus: 29.05.05;

Bonizzoni M., Malacrida A.R., Guglielmino C.R., Gomulski L.M., Gasperi G. and Zheng L. Microsatellite polymorphism in the Mediterranean fruitfly, *Ceratitis capitata*. *Insect Molecular Biology* 2000, Vol.9(3):251-261;

Botstein D., White R.L., Skolnick M., and Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 1980, Vol.32:314–331;

Bradley D.G., MacHugh D.E., Cunningham P. and Loftus R.T. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 1996 May 14, Vol. 93(10): 5131-5135;

Brohede J., Primmer C.R., Møller A. and Ellegren H. Heterogeneity in the rate and pattern of germline mutation at individual microsatellite loci. *Nucleic Acids Research* 2002, Vol.30:1997-2003;

Brohede J. and Ellegren H. Microsatellite evolution: polarity of substitution within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proceedings of Royal Society of London B, Biological Science* 1999, Vol.266:825-833;

Brinkmann B., Klintschar M., Neuhuber F., Hühne J. and Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *American Journal of Human Genetics* 1998, Vol.62:1408–1415;

Bruford M.W. and Wayne R.K. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion In Genetics And Development* 1993, Vol.3:939-943;

Bruford M.W., Bradley D.G. and Luikart G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 2003, Vol.4(11):900-910;

Bruford M.W. Conservation genetics of UK livestock: from molecules to managements Farm animal genetic resources. Eds G. Simm, B. Villanueva and S. Townsend. Nottingham University Press, Nottingham, UK 2004 Chapter 11: 151-169;

Campuzano V., Montermini L., Moltò M.D., Pianese L., Cossée M., Cavalcanti F., Monros E., Rodius F., Duclos F., Monticelli A., Zara F., Canizares J., Koutnikova H., Bidichandani S.I., Gellera C., Brice A., Trouillas P., De Michele G., Filla A., De Frutos R., Palau F., Patel P.I., Di Donato S., Mandel J-L., Coccozza S., Koenig M. and Pandolfo M. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996: Vol.271:1423-1427;

Charlesworth B., Sniegowski P. and Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 1994, Vol.371:215-220;

Chen L., Bruford M.W., Xu S., Zhou K. and Yang G. Microsatellite variation and significant population genetic structure of endangered finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*) in Chinese coastal waters and the Yangtze River . *Marine Biology* 2010, Vol.157: 1453-1462;

Chepko-Sade B.D. and Halpin, Z.T. Mammalian Dispersal Patterns: The Effects of Social Structure on Population Genetics. (Eds.) *University Of Chicago Press*. 1987;

Cockrill W.R. The water buffalo: a review. *British Veterinary Journal* 1981, Vol.137:8-16;

Colbert T., Till B.J., Tompa R., Reynolds S., Steine M.N., Yeung A.T., McCallum C.M., Comai L. and Henikoff S. High-Throughput Screening for Induced Point Mutations. *Plant Physiology* 2001, Vol.126:480-484;

Cooper A., Mourer-Chauviré C., Chambers G.K., Von Haeseler A., Wilson A.C. and S Pääbo. Independent origins of New Zealand moas and kiwis. *Proceedings of the National Academy Of Sciences of the USA* 1992, Vol.89: 8741-8744;

Cooper A. and Poinar H. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 2000, Vol.289:1139;

Croquet C., Mayeres P., Gillon A., Hammami H., Soyeurt H., Vanderick S. and Gengler N. Linear and Curvilinear Effects of Inbreeding on Production Traits for Walloon Holstein Cows. *Journal Of Dairy Science* 2007, Vol.90:465-471;

Crozier R.H., Agapow P.M. and Pedersen K. Towards complete biodiversity assessment: an evaluation of the subterranean bacterial communities in the Oklo region of the sole surviving natural nuclear reactor. *Fems Microbial Ecology* 1999.Vol.28:325-334;

Cymbron T., Freeman A.R., Malheiro M.I., Vigne J. and Bradley D.G. Microsatellite diversity suggests different histories for Mediterranean and Northern European cattle populations. *Proceedings of Royal Society B: Biological Sciences* 2005, Vol.272:1837–1843

Darwin C. On the Origin of Species. John Murray, London 1859

Di Rienzo A., Toomajian C., Sisk B., Haines K. and Barch D. et al. STRP variation in human populations and their patterns of somatic mutations in cancer patients. *American Journal of Human Genetics* 1995, Vol.57:suppl.A41;

Dodgson J.B., Cheng H.H. and Okimoto R. DNA Marker Technology: A Revolution in Animal Genetics. *Poultry Science* 1997, Vol.76:1108-1114;

Drancourt M., Aboudharam G., Signoli M., Dutour O. and Raoult D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998, Vol.95:12637.12640;

Duarte C., Maurício J., Pettitt P.B., Souto P., Trinkaus E., van der Plitch H. and Zilhão J. The early Upper Paleolithic human skeleton from the Abrigo do Lagar Velho (Portugal) and modern human

emergence in Iberia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1999, Vol.96(13):7604-7609;

Edwards C.J., Connellan J., Wallace P.F., Park S.D.E., McCormick F.M., Olsaker I., Eythorsdottir E., MacHugh D.E., Bailey J.F. and Bradley D.G. Feasibility and utility of microsatellite markers in archaeological cattle remains from a Viking Age settlement in Dublin. *Animal Genetics* 2003, Vol.34:410–416

Edwards C.J., Bollongino R., Scheu A., Chamberlain A., Tresset A., Vigne J.D., Baird J.F., Larson G., Ho S.Y.W., Heupink T.H., Shapiro B., Freeman A.R., Thomas M.G., Arbogast R.M., Arndt B., Bartosiewicz L., Benecke N., Budja M., Chaix L., Choyke A.M., Coqueugniot E., Döhle H.J., Göldner H., Hartz S., Helmer D., Herzig B., Hongo H., Mashkour M., Özdoğan M., Pucher E., Roth G., Schade-Lindig S., Schmölcke U., Schulting R.J., Stephan E., Uerpmann H.P., Vörös I., Voytek B., Bradley D.G. and Burger J. Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proceeding of Biological Sciences* 2007, Vol.274(1616):1377-1385;

Edwards C.J., Magee D.A., Park S.D.E., McGettigan P.A., Lohan A.J., Murphy A., Finlay E.K., Shapiro B., Chamberlain A.T., Richards M.B., Bradley D.G., Loftus B.J. and MacHugh D.E. A complete mitochondrial genome sequence from a mesolithic wild aurochs (*Bos primigenius*). *Plosone* 2010, Vol.5(2):e9255;

Eglinton G. and Logan G.A. Molecular preservation. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B* 1991, Vol.333:315–27;

Ellegren H. Heterogenous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature Genetics* 2000a, Vol.24:400-402;

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

Estoup A. , Jarne P. and Cornuet J-M. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 2002, Vol.11(9):1591-1604;

European Cattle Genetic Diversity Consortium. Marker-assisted conservation of European cattle breeds: an evaluation. *Animal Genetics* 2006, Vol.37: 475–481;

Fisher RA.. The genetical theory of natural selection. *Oxford: Clarendon Press* 1930;

Fletcher R.J., Bishop B.E., Leon R.P., Sclafani R.A., Ogata C.M. and Chen X.S. The structure and function of MCM from archaeal *M. thermoautotrophicum*. *Nature Structural Biology* 2003, Vol.10:160.167;

Frankham R., Ballou J.D. and Briscoe D.A. Introduction to conservation genetics. *Cambridge University Press* 2002;

Frantzen M.A.J., Silk J.B., Ferguson J.W.H., Wayne R.K. and Kohn M.H. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology* 1998, Vol.7:1423-1428;

Garner A., Rachlow J.L. and Hicks J.F. Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conservation Biology* 2005, Vol.19:1215-221;

Garrigan D. and Hedrick P.W. Perspective: detecting adaptive molecular polymorphisms: lessons from the MHC. *Evolution* 2003, Vol.57(8):1707-22;

Garza J.C., Slatkin M. and Freimer N.B. Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology and Evolution* 1995, Vol.12:594-603;

Gardner M.G., Bull C.M., Cooper S.J.B. and Duffield G. Microsatellite mutations in lizard litters. *Journal of Evolutionary Biology* 2000, Vol.13:551–560.

Gilbert M.T., Cuccui J., White W., Lynnerup N., Titball R.W., Cooper A. and Prentice M.B. Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims. *Microbiology* 2004, Vol.150(Pt 2):341-354;

Gilbert MT, Wilson AS, Bunce M, Hansen AJ, Willerslev E, Shapiro B, Higham TF, Richards MP, O'Connell TC, Tobin DJ, Janaway RC and Cooper A. Ancient mitochondrial DNA from hair. *Current Biology* 2004a, Vol.14(12):R463-464;

Gill P, Pavel L. Ivanov P.L, Kimpton C., Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E. and Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics* 1994, Vol.6:130-135

Goldstein D.B. and Schlötterer C. Microsatellites: evolution and applications. *Oxford University Press*, Oxford. 1999;

Green R.E., Malaspinas A.S., Krause J., Briggs A.W., Johnson P.L., Uhler C., Meyer M., Good J.M., Maricic T., Stenzel U., Prüfer K., Siebauer M., Burbano H.A., Ronan M., Rothberg J.M., Egholm M., Rudan P., Brajković D., Kućan Z., Gusić I., Wikström M., Laakkonen L., Kelso J., Slatkin M. and Pääbo S. A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell* 2008, Vol.134(3):416.26;

Groombridge J.J., Jones C.G., Bruford M.W. and Nichols R.A. “Ghost” alleles of the Mauritius kestrel. *Nature* 2000, Vol.403(6770):616;

Haas C.J., Zink A., Molnar E., Szeimies U. and Reischl U, Marcsik A., Ardagna Y., Dutour O., Pálfi G. and Nerlich A.G. Molecular evidence for different stages of tuberculosis in ancient bone samples from Hungary. *American Journal of Physical Anthropology* 2000, Vol.113:293–304;

Hancock J.M. *Microsatellites* and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In *Microsatellites: Evolution and Applications*. Edited by D.B. Goldstein and C. Schlötterer. Oxford University Press, Oxford. 1999. pp.1-9;

Handley L.J., Byrne K., Santucci F., Townsend S., Taylor M., Bruford M.W. and Hewitt G.M. Genetic structure of European sheep breeds. *Heredity* 2007, Vol.99: 620–631;

Handt O., Hoss M., Krings M. and Paabo S. Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia* 1994, Vol.50:524–529;

Harding R.M., Boyce A.J. and Clegg J.B. The Evolution of Tandemly Repetitive DNA: Recombination Rules. *Genetics* 1992, Vol.132:847-859;

Hartl D.L. and Clark A.G. Genetica di popolazione, Zanichelli, Bologna, 1993;

Hawks J. and Wolpoff M.H. The accretion model of Neanderthal evolution. *Evolution* 2001, Vol.55:1474-1485;

Hedrick, P. Genetics of Populations, 3rd ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers. 2005;

Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O.A. and Wilson A.C. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 1984, Vol.312:282-284;

Hoelzel R. Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life-history; a case study of the northern elephant seal. *Biological Journal of the Linnean Society* 1999, Vol.68:23-39;

Hofreiter M., Serre D., Poinar H.N., Kuch M. and Pääbo S. Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics* 2001, Vol.2:353-59;

Hofreiter M. and Vigilant L. Ancient human DNA: phylogenetic applications. *Encyclopedia of the Human Genome*, 2003, Vol.1:116-119;

Höss M., Jaruga P., Zastawny T.H., Dizdaroglu M. and Pääbo S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research* 1996, Vol.24:1304–1307;

Höss M., Pääbo S. and Vereshchagin N.K. Mammoth DNA sequences. *Nature* 1994, Vol.370:333;

Huynen L., Millar C.D., Scofield R.P. and Lambert D.M. Nuclear DNA sequences detect species limits in ancient moa. *Nature* 2003, Vol.425:175-178;

Jaenicke-Despres V, Buckler E.S., Smith B.D., Gilbert M.T.P., Cooper A., Doebley J. and Pääbo S. Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. *Science* 2003, Vol.302:1206–8;

Jakupciak J.P. and Wells R.D. Genetic instabilities in (CTG/CAG) repeats occur by recombination. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, Vol.274:23468-23469;

Kashi Y., King D. and Soller M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics* 1997, Vol.13:74-78;

Kimura M. "Evolutionary rate at the molecular level". *Nature* 1968, Vol.217:624-626;

Krajewski C., Buckley L. and Westerman M. DNA phylogeny of marsupial wolf resolved. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 1997, Vol.264:911-917;

Kremer E.J., Pritchard M., Lynch M., Yu S., Holman K., Baker E., Warren S.T. Schlessinger D., Sutherland G.R. and Richards R.I. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* 1991, Vol.252: 1711-1714;

Krings M., Stone A., Schmitz R.W., Krainitzki H., Stoneking M. and Pääbo S. Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 1997, Vol.90:19-30;

Krings M., Geisert H., Schmitz R.W., Krainitzki H. and Pääbo S. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neanderthal type specimen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1999, Vol.96:5581-5585;

Krings M., Capelli C., Tschentscher F., Geisert H., Meyer S., Von Haeseler A., Grossschmidt K., Possnert G., Paunovic M. and Pääbo S. A view of Neanderthal genetic diversity. *Nature Genetics* 2000, Vol.26:144-146;

Kumar S., Gupta J., Kumar N., Dikshit K., Navani N., Jain P. and Nagarajan M. Genetic variation and relationships among eight Indian riverine buffalo breeds. *Molecular Ecology* 2006, Vol.15: 593-600;

Kumar S., Nagarajan M., Sandhu J.S., Kumar N. and Behl V. Phylogeography and domestication of Indian river buffalo. *BMC Evolutionary Biology* 2007a, Vol.7:186-193;

Kumar S., Nagarajan M., Sandhu J.S., Kumar N., Behl V. and Nishanth G. Mitochondrial DNA analyses of Indian water buffalo support a distinct genetic origin of river and swamp buffalo. *Animal Genetics* 2007b, Vol.38:227–32;

Lande R. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 1988, Vol.241(4872):1455-60;

Landegren U., Nilsson M. and Kwok P.Y. Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Research* 1998, Vol.8:769-776;

Larson G, Dobney K., Albarella U., Fang M., Smith M.E., Robins J., Lowden S., Finlayson H., Brand T., Willerslev E., Rowley Conwy P., Andersson L. and Cooper A. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 2005, Vol.307(5715):1618-21;

Lau C.H., Drinkwater R.D., Yusoff K., Tan S.G., Hetzel D.J. and Barker J.S. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. *Animal Genetics* 1998, Vol.29:253–64;

Lei C.Z., Zhang W., Chen H., Lu F., Yang X.Y., Zhang H.C., Liu Z.G., Yao L.B., Lu Z.F. and Zhao Z.L. Independent maternal origin of Chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Genetics* 2007, Vol.38:97–102;

Leonard J.A., Wayne R.K. and Cooper A. Population genetics of Ice Age polar bear. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000, Vol.97:1651.1654;

Levinson G. and Gutman G. A. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* 1987, Vol.15:5323-533;

Lindahl T and Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1972, Vol.11:3610;

Lindahl T and Karlstro O. Heatinduced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* 1973, Vol.12:5151.54;

Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993, Vol.362:709-15;

Liu K. and Muse S.V. POWERMARKER: integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 2005, 21:2128–2129;

Loftus R.T., MacHugh D.E., Bradley D.G., Sharp P.M. and Cunningham P. Evidence for two independent domestication of cattle *Proceedings Of National Academy Of Sciences USA* 1994, Vol. 91(7):2757-2761;

Loreille O.M., Diegoli T.M., Irwin J.A., Coble M.D. and Parsons T.J. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International Genetics* 2007, 1:191–195;

Luikart G. and Cornuet J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 1998, Vol.12:228-237;

Lynn D.J., Lloyd A.T., Fares M.A., O'Farrelly C. Evidence of positively selected sites in mammalian alpha-defensins. *Molecular Biology And Evolution* 2004, Vol.21(5):819-827;

MacHugh D.E., Shriver M.D., Loftus R.T., Cunningham P. and Bradley D.G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and Zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*.) *Genetics* 1997, Vol. 146:1071-1086;

Martín-Burriel I., Rodellar C., Lenstra J.A., Sanz A., Cons C., Osta R., Reta M., De Argüello S., Sanz A. and Zaragoza P. Genetic Diversity and Relationship of Endangered Spanish Cattle Breeds. *Journal Of Heredity* 2007, Vol.98(7):687-691;

Mc Parland S., Kearney J.F., Rath M. and Berry D.P. Inbreeding Effects on Milk Production, Calving Performance, Fertility, and Conformation in Irish Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science* 2007, Vol.90:4411-4419;

Medugorac I., Medugorac A., Russi I., Veit-Kensch C.E., Taberlet P., Luntz B., Mix H.M.¶ and Forsters M. Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size. *Molecular Ecology* 2009, 16:3394-3410;

Moioli B., Georgoudis A., Napolitano F., Catillo G., Lucioli S., Ligda Ch. and Boyazoglu J. Genetic diversity between Italian and Greek buffalo populations. *Animal Genetic Resources Information* 2001, 29:31-40;

Moore H., Greenwell P.W., Liu C.P., Arnheim N. and Petes T.D. Triplet repeats form secondary structures that escape DNA repair in yeast. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 1999:Vol.96:1504-1509;

Morgante M., Hanafey M. and Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* 2002, Vol.30:194-200;

Morin P.A., Luikart G., Wayne R.K. and SNP working group. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 2004 April, Vol. 4 (19): 208-216;

Mullis K.B. and Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987, Vol.155:335-50.

Nadir E., Margalit H., Gallily T. and Ben-Sasson S.A. Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1996, Vol.93:6470-6475;

Nei M. The theory and estimation of genetic distance *Genetic structure of populations* 1973, Edited by N.E.Morton, University Hawaii Press, Honolulu;

Nei M. and Graur D. Extent of protein polymorphism and the neutral mutation theory. *Evolution Biology* 1984, Vol.17:73–118;

Nordstrom T., Ronaghi M., Forsberg L., De Faire U., Morgenstern R. and Nyren P. Direct analysis of single nucleotide polymorphism on double stranded DNA by pyrosequencing. *Biotechnology Applied Biochemistry* 2000, (Pt 2):107-112;

Ovchinnikov I.V., Götherström A., Romanova G.P., Kharitonov V.M., Lidén K. and Goodwin W. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature* 2000, Vol.404:490-493;

Pääbo S. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 1985, Vol.314:44-645;

Pääbo S. *Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. Proceedings of The National Academy of Sciences USA* 1989, Vol.86:1939-43;

Pariset L, Savarese M C, Cappuccio I and Valentini A. Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 2003, Vol.120: 425-432;

Pariset L., Cappuccio I., Ajmone Marsan P., Dunner S., Luikart G., England P.R., Obexer-Ruff G., Peter C., Marletta D., Pilla F., *et al.* Assessment of population structure by single nucleotide polymorphisms (SNPs) in goat breeds. *Journal of Chromatography B* 2006, 833(1):117-120

Pastinen T., Kurg A., Metspalu A., Peltonen L., and Syvänen A.C. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Research* 1997, Vol. 7:606-614;

Peakall R. and Smouse P.E. GENEALX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 2006, Vol.6:288–295;

Pellecchia M., Negrini R., Colli L., Patrini M., Milanesi E., Achilli A., Bertorelle G., Cavalli-Sforza L.L., Piazza A., Torroni A., Ajmone-Marsan P. The mystery of Etruscan origins: Novel clues from *Bos taurus* mitochondrial DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2007, Vol.274(1614):1175-1179

Piperno D.R. and Flannery K.V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2001, Vol.98:2101–2103;

Piry S., Luikart G. and Cornuet J.M. Bottleneck 1.2.02: a program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data. 1999. Available at: <http://www.ensam.inra.fr/URLB> (accessed on 9 September 2009);

Primmer C.R., Ellegren H., Saino N. and Moller A.P. Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nature Genetics* 1996, Vol.13:391-393;

Pritchard J.K., Stephens M. and Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000, Vol.155:945-59;

Pupko T. and Graur D. Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of length and number of repeated units. *Journal Of Molecular Evolution* 1999, Vol.48:313-316;

Queney G., Ferrand N., Weiss S., Mougat F. and Monnerot M. Stationary distributions of microsatellite loci between divergent population groups of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Molecular Biology and Evolution* 2001, Vol.18:2169-2178;

Raoult D., Aboudharam G., Crubézy E., Larrouy G., Ludes B. and Drancourt M. Molecular identification by "suicide PCR" of *Yersinia pestis* as the agent of medieval black death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000, Vol.97(23):12800-12803;

Raymond M. and Rousset F. Genepop (version 3.4): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 1995, Vol.86:248-9;

Rebbbeck T.R., Spitz M. and Wu X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nature Review Genetics* 2004, Vol.5:589-597;

Reed D.H. and Frankham R. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 2003, Vol.17(1):230-237;

Reid A.H., Fanning T.G., Hultin J.V. and Taubenberger J.K. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1999, Vol.96(4):1651-1656;

Richard G.F. and Paques F. Mini and Microsatellite expansion: the recombination connection. *Embo Reports* 2000, Vol.1(2):122.6;

Rose O. and Falush D. A threshold size for microsatellite expansion. *Molecular Biology And Evolution* 1998, Vol.15:613-615.

Ross P., Hall L. and Haff L.A. Quantitative approach to single-nucleotide polymorphisms analysis using MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechniques* 2000, Vol.29:620-629;

Rice W.R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 1989, Vol.43:223-225;

Sabeti P.C., Reich D.E., Higgins J.M., Levine H.Z.P., Richter D.J., Schaffner S.F., Gabriel S.B., Platko J.V., Patterson N.J., McDonald G.J., Ackerman H.C., Campbell S.J., Altshuler D., Cooper R., Kwiatkowski D., Ward R. and Lander E.S. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* 2002, Vol. 419:832-837;

Saunders G.C., Dukes J., Parkes H.C. and Cornett J.H. Interlaboratory study on thermal cycler performance in controlled PCR and random amplified polymorphic DNA analyses *Clinical Chemistry* 2001, Vol.47(1):47-55;

Schaaper R.M., Kunkel T.A. and Loeb L.A. Infidelity of DNA-synthesis associated with bypass of apurinic sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1983, Vol.80:487.91;

Schierwater B. and Ender A. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acid Research* 1993, Vol. 21:4647-4648;

Schlötterer C. and Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acid Research* 1992, Vol.20(2):211-215;

Schmitz R.W., Serre D., Bonani G., Feine S., Hillgruber F., Krainitzki H., Pääbo S. and Smith F.H. The Neandertal type site revisited: Interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2002, Vol.99:13342-13347;

Sewalem A., Kistemaker J.B., Miglior F. and Van Doormal B.J. Analysis of inbreeding and its relationship with functional longevity in Canadian dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2006, Vol.89(6):2210-2216;

Shapiro R. Damage to DNA caused by hydrolysis. In *Chromosome Damage and Repair*, ed. E Seeberg, K Kleppe, 1981, pp. 3.12. New York: Plenum;

Shen R., Fan J.B., Campbell D., Chang W., Chen J., Doucet D., Yeakley J., Bibikova M., Wickham Garcia E., McBride C., Steemers F., Garcia F., Kermani B. G., Gunderson K. and Oliphant A. High throughput SNP genotyping on universal bead arrays. *Mutation Research* 2005, Vol.573:70–82;

Slatkin M. “A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution”. *Genetical Research*. 1996, Vol.68. 259-260;

Smith C.I., Chamberlain A.T., Riley M.S., Cooper A., Stringer C.B. and Collins M.J. Neanderthal DNA: not just old but old and cold?. *Nature* 2001, Vol.10:771–772

Soysal M.I., Tuna Y.T. and Gurcan E.K. An Investigation on the Water Buffalo Breeding in Danamandira Village of Silivri District of Istanbul Province of Turkey. *Journal of Ttekirdag Agricultural Faculty* 2005, Vol.2:73–78;

Soysal M.I., Tuna Y.T., Gurcan E.K., Ozan E., Kok S., Castellano N., Cobanoglu O. and Barone C.M.A. Anatolian water buffaloes husbandry in Turkey: preliminary results on somatic characterization. *Italian Journal of Animal Science* 2007, Vol.6:1302–1307, World Buffalo Congress. Caserta;

Strassmann J.E., Zhu Y. and Queller D.C. Altruism and social cheating in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 2000, Vol.408:965-967;

Stringer C.B. and Andrews P. Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans. *Science* 1988, Vol.239(4845):1263-1268;

Stringer C. Modern human origins: progress and prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London (B)* 2002, Vol.357:563-579;

Sultana S. and Mannen H., Tsuji S. Mitochondrial DNA diversità of Pakistani goats. *Animal Genetics* 2003, Vol.34:417-421;

Suzuki A., Maruno A., Tahira T. and Hayashi K. Polar alteration of short tandem repeats (STRs) in mammalian cells. *Mutation Research* 2001, Vol.474:159-168;

Taberlet P. and Luikart G. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* 1999, Vol.68:41-55;

Taberlet P, Valentini A, Rezaei HR, Naderi S, Pompanon F, Negrini R and Ajmone-Marsan P. Are cattle, sheep and goats endangered species? *Molecular Ecology* 2008, Vol.17(1):275-284;

Tachida H. and Iizuka M. Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics* 1992, Vol.131:471-478;

Tautz D., Trick M. and Dover G.A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 1986, Vol.322:652-656;

Thompson J.R., Everett R.W. and Hammerschmidt N.L. Effects of inbreeding on production and survival in Holsteins. *Journal of Dairy Science* 2000a, Vol.83:1856-1864;

Toth G., Gaspari Z. and Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 2000, Vol.10:967-981;

Trinkaus E. and Duarte C. The hybrid child from Portugal. *Scientific American* 2000, Vol.282(4):102-103;

Troy C.S., MacHugh D.E., Bailey J.F., Magee D.A., Loftus R.T., Cunningham P., Chamberlain A.T., Sykes B.C. and Bradley D.G. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle *Nature* 2001, Vol.410(6832):1088-91;

Twyman R.M. and Primrose S.B. Techniques patents for SNP genotyping. *Pharmacogenomics* 2003, Vol. 4(1):67-79;

Valentini A., Timperio A.M., Cappuccio I. and Zolla L. 'Random amplified polymorphic DNA (RAPD) interpretation requires a sensitive method for the detection of amplified DNA. *Electrophoresis* 1996, Vol.17:1553-1554;

Van Hooft W.F., Groen A.F. and Prins H.H.T. Microsatellite analysis of genetic diversity in African buffalo (*Syncerus caffer*) populations throughout Africa. *Molecular Ecology* 2000, Vol.9:2017-2025;

Vargo E.L. Polymorphism at trinucleotide microsatellite loci in the subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*. *Molecular Ecology* 2000, Vol.9:817-820;

Vasan S, Zhang X., Zhang X., Kapurniotu A., Bernhagen J., Teichberg S., Basgen J., Wagle D., Shih D., Terlecky I., Bucala R., Cerami A., Egan J. and Ulrich P. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature* 1996, Vol.382:275-278;

Vignal A., Milan D., SanCistobal M. and Eggen André. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetic Selection and Evolution* 2002, Vol. 34:275-305;

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 1995, Vol.23(21):4407-4414;

Wang Z., Weber J.L., Zhong G. and Tanksley S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 1994, Vol.88:1-6;

Wang R.L., Stec A., Hey J., Lukens L. and Doebley J. The limits of selection during maize domestication. *Nature* 1999, Vol.398:236–239

Weber J.L. and May P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal Of Human Genetics* 1989, Vol.44(3):388-396;

Weber J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 1990, Vol.7:524–530;

Whitt S.R., Wilson L.M., Tenaillon M.I., Gaut B.S. and Buckler IV E.S. Genetic diversity and selection in the maize starch pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences Usa*. 2002, Vol.99:12959-12962;

Wier B.S. and Cockerham C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 1984, Vol.38:1358-1370;

Willerslev E., Hansen A.J., Binladen J., Brand T.B., Gilbert M.T.P., Shapiro B., Bunce M., Wiuf C., Gilichinsky D.A. and Cooper A. Diverse Plant and Animal Genetic Records from Holocene and Pleistocene Sediments. *Science* 2003, Vol.300(5620):791-795;

Willerslev E., Hansen A.J., Ronn R., Brand T.B., Barnes I., Wiuf C., Gilichinsky D.A., Mitchell D.J. and Cooper A. Long-term persistence of bacterial DNA. *Current Biology* 2004, Vol.14(1):R9-R10;

Williams J.A., Scott I.M., Atkin A.L., Brook W.J., Russell M.A., Bell J.B. Genetic and molecular analysis of vgU and vgW: two dominant vg alleles associated with gene fusions in *Drosophila*. *Genetics* 1990, Vol.125: 833-844.

Wolford J.K., Blunt D., Ballecer C. and Prochazka M. High throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Human Genetics* 2000, Vol.107(5):483-487;

Wolpoff M.H., Hawks J., Frayer D.W. and Hunley K. Modern human ancestry at the peripheries: a test of the replacement theory. *Science* 2001, Vol.291(5502):293-297;

Wright S. Coefficients of Inbreeding and Relationship. *The American Naturalist* 1922, Vol.56:330-338;

Wright S. "The evolution of dominance". *The American Naturalist* 1929, Vol.63 (689):556–61;

Wright S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 1951, Vol.115: 323-354;

Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 1965, Vol.19:39-420;

Xu X., Peng M., Fang Z. and Xu X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature Genetics* 2000, Vol.24: 396–399;

Yang D.Y., Eng B., Wayne J.S., Dudar J.C. and Saunders S.R. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology* 1998, Vol.105:539–543;

Yang D.Y., Liu L., Chen X. and Speller C.F. Wild or domesticated: DNA analysis of ancient water buffalo remains from north China. *Journal of Archaeological Science* 2008, Vol.35:2778–85;

Zhang B., Li M., Zhang Z., Goossens B., Zhu L., Zhang S., Hu J., Bruford M.W. and Wei F.: Genetic Viability and Population History of the Giant Panda, Putting an End to the "Evolutionary Dead End"? *Molecular Biology and Evolution* 2007, Vol.24(8):1801–1810;

Zhang Y., Sun D., Yu Y. and Zhang Y. Genetic diversity and differentiation of Chinese domestic buffalo based on 30 microsatellite markers. *Animal Genetics* 2007, Vol.38:569-575;

Zink A., Haas C.J., Reischl U., Szeimies U. and Nerlich A.G. Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *Journal of Medical Microbiology* 2001, Vol.50:355–66.

;

.

;

;

.

