

I MICROSATELLITI DEL DNA QUALE MEZZO EFFICACE DI VALUTAZIONE DELLA VARIABILITÀ GENETICA

DNA MICROSATELLITES AS TOOLS FOR EVALUATING GENETIC VARIABILITY

ROBERTA CIAMPOLINI ⁽¹⁾, ELISA MAZZANTI ⁽¹⁾

RIASSUNTO

L'applicabilità della formula genomica (Genotipo Multilocus Individuale) (Ciampolini e coll., 1995) per la ricerca di QTL dipende dalla bontà della scelta del pool di microsatelliti, considerando il loro diverso contenuto informativo.

Questa nota ha inteso affrontare il problema, mettendo a punto una metodologia atta a evidenziare quali marcatori siano più utili alla definizione della variabilità di una popolazione ed a migliorare il significato della formula genomica quale indice di caratteristiche morfologiche.

I risultati hanno evidenziato un contributo diverso dei singoli microsatelliti, alcuni dei quali hanno manifestato uno specifico collegamento con misurazioni somatiche.

Parole chiave: variabilità genetica, marcatori microsatelliti, Individual Multilocus Genotype (IMG), razza bovina Piemontese, QTL.

SUMMARY

The concrete utilization of the genomic formula (Individual Multilocus Genotype - Ciampolini et al., 1995), for the identification of QTL depends on the suitability of the pool of microsatellites, in view of their different information content.

This paper face the problem, utilizing a methodology suitable for evidencing which markers are more useful to define the variability of a population and improve the significance of the IMG, as index of quantitative traits.

The results evidenced a different contribution of each of the microsatellites, some displaying a specific relation with somatic measures.

Key words: genetic variability, microsatellites markers, Individual Multilocus Genotype (IMG), Piemontese beef breed QTL.

⁽¹⁾ Dipartimento di Produzioni Animali - Direttore Prof. Dario Cianci.

INTRODUZIONE

Ai marcatori genomici microsatelliti viene attribuita grande efficienza per la stima della variabilità tra ed entro popolazioni: a) perché rispetto ai prodotti genici, si comportano come caratteri mendeliani semplici di tipo codominante; b) perché hanno un elevato polimorfismo in confronto ad altri marcatori molecolari (Mac Hugh e coll., 1988; Peelman e coll., 1998; Blott e coll., 1999).

Una metodologia che rende ancora più efficace la loro applicazione nella misura della variabilità, soprattutto entro popolazioni, è quella del Genotipo Multilocus Individuale (Ciampolini e coll., 1994, 1995) che permette la definizione della rassomiglianza genetica entro una popolazione, nonché la ripartizione “a posteriori” della popolazione stessa in sotto popolazioni ciascuna geneticamente più omogenea.

Un problema particolarmente sentito per queste applicazioni è quello della scelta del pool di microsatelliti più utili alla definizione della variabilità, poiché non tutti i marcatori apportano un uguale contributo. L'interesse è ancora maggiore nel caso in cui oltre alla stima della rassomiglianza intrapopolazione o della distanza tra popolazioni condotta per analisi filogenetiche, si intendono differenziare con il Genotipo Multilocus Individuale sottopopolazioni che possano essere distinte anche per caratteri morfo-funzionali e quindi per la ricerca di possibili associazioni con QTL.

In questo lavoro, una metodologia specifica applicata alla razza bovina da carne Piemontese, ha avuto l'obiettivo di valutare il contributo di ciascun microsatellite alla stima della variabilità intrarazza ed entro sottopopolazioni, nonché la variazione indotta sulle misurazioni somatiche dal diverso assortimento delle sottopopolazioni.

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata condotta su 54 torelli a groppa doppia in prova di performance. Le valutazioni morfo-funzionali previste dal Regolamento della razza sono state eseguite a cura dell'ANABORAPI, che qui si ringrazia per aver concesso i dati. L'analisi del DNA è stata eseguita anche su 6 soggetti non a groppa doppia.

Analisi del DNA - Il DNA è stato estratto da campioni di 20 ml di sangue periferico, utilizzando il metodo descritto da Jeanpierre (1987).

Le reazioni di PCR e le procedure per determinare i genotipi dei microsatelliti sono state condotte secondo la metodologia descritta da Vaiman e coll. (1994). Le dimensioni degli alleli sono state stimate usando una sequenza M13 come campione di riferimento caricato su ogni gel di migrazione.

Per questo lavoro sono stati impiegati 20 microsatelliti, diciassette prodotti nei laboratori INRA (Vaiman e coll., 1994) e gli altri da Steffen e coll. (1993). Tre dei microsatelliti utilizzati sono ripetizioni imperfette (CA)_n; uno (INRA 31) è una ripetizione (TA). I microsatelliti sono stati scelti in accordo con il loro polimorfismo, stimato, per quelli INRA, su un panel di 40 soggetti non parenti (Vaiman e coll., 1994).

Informazioni sui 20 microsatelliti studiati sono presentate nella Tabella I.

Analisi statistica - Ha previsto l'applicazione del pacchetto Byosis per il calcolo delle frequenze alleliche, del rispetto delle proporzioni di Hardy-Weinberg, dell'eccesso o difetto di eterozigoti, nonché della distanza genetica secondo Cavalli Sforza e Edwards (1967).

Le rassomiglianze genetiche tra ed entro popolazioni sono state stimate con le metodologie di Ciampolini e coll. (1995) che prevede l'impiego del Genotipo Multilocus Individuale (IGM).

Ogni soggetto è stato definito mediante il proprio genotipo multilocus (nel nostro caso 20 loci microsatelliti) costituito da una serie di 40 alleli per ogni animale. Per stimare la rassomiglianza genetica tra due individui o tra due gruppi di individui, viene calcolata la proporzione (P) di alleli comuni (A) in relazione alle 2L possibilità (L = numero di loci considerati).

La rassomiglianza genetica è misurata da $P = A/2L$ e la distanza genetica è $1-P$. Le rassomiglianze calcolate tra ogni coppia di soggetti sono mediate per ottenere valori di rassomiglianza entro razze o sottopopolazioni. Per stimare la rassomiglianza (o la distanza genetica) tra razze o sottopopolazioni vengono calcolati i valori medi delle rassomiglianze tra ogni soggetto di un gruppo e ciascun soggetto del gruppo a confronto.

Scomposizione della variabilità intrarazza - A causa della grande

Tab. I. Microsatelliti analizzati e loro polimorfismo.

Marcatore	Locus	Cromosoma	Bibliografia	Numero di alleli
INRA 5	D12S4	12	Vaiman e coll., 1994	5
INRA 6	D3S9	3	Vaiman e coll., 1994	6
INRA 11	D1S6	1	Vaiman e coll., 1994	10
INRA 13	D16S10	16	Vaiman e coll., 1994	9
INRA 16	D27S16	27	Vaiman e coll., 1994	10
INRA 23	D3S10	3	Vaiman e coll., 1994	11
INRA 25	D17S6	17	Vaiman e coll., 1994	8
INRA 27	D27S20	27	Vaiman e coll., 1994	6
INRA 31	D21S12	21	Vaiman e coll., 1994	6
INRA 32	D11S9	11	Vaiman e coll., 1994	9
INRA 35	D16S11	16	Vaiman e coll., 1994	7
INRA 37	D10S12	10	Vaiman e coll., 1994	12
INRA 50	D15S6	15	Vaiman e coll., 1994	10
INRA 53	D7S6	7	Vaiman e coll., 1994	5
INRA 63	D18S5	18	Vaiman e coll., 1994	7
INRA 64	D23S15	23	Vaiman e coll., 1994	6
INRA 72	D4S11	4	Vaiman e coll., 1994	10
ETH 131	D21S4	21	Steffen e coll., 1993	13
ETH 152	D5S1	5	Steffen e coll., 1993	7
ETH 225	D9S1	9	Steffen e coll., 1993	5

variabilità osservata entro individui della stessa popolazione (Ciampolini e coll., 1995) il campione studiato della razza Piemontese è stato suddiviso in sottopopolazioni secondo le province di origine, nonché, *a posteriori*, secondo la loro rassomiglianza genetica con tutti gli altri soggetti del campione.

Allo scopo ogni individuo è stato classificato in due sottopopolazioni una (HGS) costituita da soggetti ad alta rassomiglianza genetica con tutti gli altri individui raggruppati nella stessa sottopopolazione, la seconda (LGS) a bassa rassomiglianza genetica (Ciampolini e coll., 1995).

Si è poi verificato se, escludendo dal IMG un microsatellite per volta, con i restanti 19 microsatelliti si conserva la stessa variabilità intrarazza e la stessa composizione delle sotto popolazioni HSG o LGS ovvero se vi siano degli spostamenti di soggetti da un raggruppamento all'altro.

Tab. II. Similarità genetica intra razza ed intra sottopopolazioni HGS ed LGS stimata con il panel completo dei 20 microsattelliti nonché con panels di 19 microsattelliti ottenuti non considerando un microsattellite alla volta.

	Intra razza	HGS	LGS
A 20 microsattelliti	0,366	0,404	0,344
A 19 microsattelliti Togliendo il μ	Intra razza	HGS	LGS
INRA 5	- 0,359	= 0,401	- 0,335
INRA 6	- 0,357	- 0,396	- 0,337
INRA 11	- 0,358	- 0,399	- 0,332
INRA 13	+ 0,372	+ 0,414	= 0,343
INRA 16	+ 0,374	= 0,406	+ 0,350
INRA 23	+ 0,375	+ 0,413	= 0,344
INRA 25	= 0,367	= 0,403	= 0,344
INRA 27	= 0,366	= 0,400	= 0,343
INRA 31	- 0,359	- 0,391	- 0,355
INRA 32	= 0,362	+ 0,412	- 0,337
INRA 35	= 0,363	- 0,397	- 0,337
INRA 37	+ 0,377	+ 0,419	- 0,338
INRA 50	= 0,370	+ 0,410	- 0,337
INRA 53	= 0,363	= 0,404	- 0,337
INRA 63	= 0,364	+ 0,409	= 0,343
INRA 64	= 0,367	= 0,406	- 0,336
INRA 72	= 0,367	= 0,400	= 0,344
ETH 131	+ 0,377	+ 0,419	= 0,340
ETH 152	= 0,362	- 0,395	- 0,326
ETH 225	= 0,366	= 0,403	= 0,341

Si è ritenuto perciò opportuno il calcolo della rassomiglianza intrarazza ed intra sottopopolazione nonché quella dei valori medi di ciascuna misura nei 20 raggruppamenti HGS ed LGS ottenuti dall'eliminazione di un microsattellite per volta. Questi valori medi sono stati confrontati con i valori ottenuti con la stima a 20 microsattelliti per valutare il contributo di ciascun microsattellite alla variabilità dei gruppi di soggetti anche nei valori medi delle loro misurazioni somatiche.

Tab. III. Percentuale dei soggetti che si sono spostati da HGS a LGS e viceversa sottraendo un microsatellite alla volta.

Marcatori	N° spostamenti		Percentuale spostamenti		Totale
	Da H in L	Da L in H	Da H in L	Da L in H	
INRA 5	1	0	2,1%	–	2,1%
INRA 6	1	0	2,1%	–	2,1%
INRA 11	0	1	–	2,1%	2,1%
INRA 13	0	2	–	4,3%	4,3%
INRA 16	1	3	2,1%	6,4%	8,5%
INRA 23	5	7	10,6%	14,9%	25,5%
INRA 25	6	5	12,8%	10,6%	23,4%
INRA 27	7	7	14,9%	14,9%	29,8%
INRA 31	7	7	14,9%	14,9%	29,8%
INRA 32	7	5	14,9%	10,6%	25,5%
INRA 35	5	6	10,6%	12,8%	23,4%
INRA 37	4	8	8,5%	17,0%	25,5%
INRA 50	4	7	8,5%	14,9%	23,4%
INRA 53	6	5	12,8%	10,6%	23,4%
INRA 63	7	5	14,9%	10,6%	25,5%
INRA 64	5	7	10,6%	14,9%	25,5%
INRA 72	5	4	10,6%	8,5%	19,1%
ETH 131	4	8	8,5%	17,0%	25,5%
ETH 152	5	10	10,6%	21,3%	31,9%
ETH 225	8	8	17,0%	17,0%	34,0%

RISULTATI

La rassomiglianza genetica (omogeneità) stimata con 19 microsatelliti (escludendone uno per volta) all'interno della popolazione nonché delle sottopopolazioni HGS e LGS è riportata nella Tabella II. Si rileva che l'assenza dall'IMG (Individual Multilocus Genotype) di un microsatellite porta talvolta all'aumento del valore di stima della variabilità intrapopolazione e ciò è ovvio in relazione al polimorfismo dei microsatelliti stessi che contribuisce a rendere più esatta la valutazione. È comunque interessante considerare le differenze tra microsatelliti; infatti l'eliminazione dalla formula degli INRA 13, 16, 23, 37 e di ETH 131 comporta un forte aumento dell'omogeneità dimostrando il loro marcato contributo alla stima della variabilità. All'opposto tutti gli altri marcatori determinano modeste variazioni.

Tab. IV. Contributo di ciascun microsatellite alle misure morfo-funzionali nelle sottopopolazioni LGS e HGS.

Microsatellite	Misurazioni modificate
INRA 5	Nessuna
INRA 6	Significativi per peso a 150 ed incrementi
INRA 11	Altezza garrese e croce, lunghezza tronco, peso vivo
INRA 13	Nessuna
INRA 16	Altezza garrese e croce, lunghezza tronco, peso vivo, valutazione referees
INRA 23	Valutazione referees
INRA 25	Peso vivo
INRA 27	Peso vivo
INRA 31	Peso vivo
INRA 32	Peso vivo
INRA 35	Valutazione referees
INRA 37	Lunghezza tronco, peso vivo, valutazione referees
INRA 50	Valutazione referees
INRA 53	Lunghezza tronco, peso vivo, valutazione referees
INRA 63	Peso vivo
INRA 64	Nessuna
INRA 72	Valutazione referees
ETH 131	Valutazione referees
ETH 152	Lunghezza tronco, peso vivo, valutazione referees
ETH 225	Altezza garrese e croce, lunghezza tronco, peso vivo

Anche le sottopopolazioni HGS e LGS subiscono modificazioni della loro omogeneità genetica; qui risultano, molto interessanti per la stima della variabilità i microsatelliti INRA 13, 23, 32, 37 e ETH 131, per gli HGS e l'INRA 16 per gli LGS.

Come si rileva i microsatelliti interessati alla variabilità nella popolazione in toto lo sono anche per le sottopopolazioni ma in misura più rilevante per gli HGS.

Va sottolineato che le sottopopolazioni HGS e LGS con le formule a 19 microsatelliti non risultano più composte dagli stessi soggetti. Come si rileva dalla Tabella III i microsatelliti INRA 5, 6, 11, 13 e 16 spostano in misura modesta i soggetti da una sottopopolazione all'altra nel caso che non siano (o che siano) presenti; essi sono perciò ininfluenti nel definire le due sottopopolazioni.

Gli altri microsatelliti determinano invece significativi spostamenti. Tutto ciò comporta una modifica dei valori medi delle misure degli

HGS ed LGS. I risultati ottenuti sono quelli della Tabella IV dalla quale si rileva che i microsatelliti INRA 5, 13 e 64 sono indifferenti sulle misure. I restanti microsatelliti apportano tutti un contributo alla definizione della tipologia morfo-funzionale dei soggetti HGS ed LGS.

Si è perciò riproposta una formula genomica con i 17 microsatelliti significativi. La sua applicazione alla stima della variabilità intrapopolazione non ha ulteriormente chiarito il significato di ciascun microsatellite quale marcatore di specifici caratteri morfo-funzionali, ma ha determinato un drammatico aumento della omogeneità intrapopolazione dallo 0,398 ottenuto con i 20 microsatelliti allo 0,594 stimato con la formula con i 16 microsatelliti prescelti.

DISCUSSIONE

Dai risultati precedentemente esposti si possono ricavare almeno due interessanti considerazioni:

- il contributo di ciascun microsatellite alla definizione di sottopopolazioni lascia ipotizzare una connessione tra marcatori e caratteristiche morfo-funzionali;
- la stima della rassomiglianza genetica intrapopolazione (o della variabilità, complementare al valore di stima) dipende molto dai marcatori prescelti e dal loro significato (di associazione?) nell'ambito della tipologia genetica dei soggetti studiati.

BIBLIOGRAFIA

- BLOTT S.C., WILLIAMS J.L., HALEY C.S. (1999). Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity*, 82: 613-619.
- CAVALLI SFORZA L.L., EDWARDS A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis, models and estimation procedures. *An. Jour. of Human Genetics*, 19: 233-257.
- CIAMPOLINI R., CIANCI D. (1994). Metodologie genomiche per la individuazione della razza di appartenenza di un soggetto o di un suo tessuto. *Italian beef cattle contest*. 224-229, Perugia 16-18 settembre 94.
- CIAMPOLINI R., MOAZAMI-GOUDARZI K., VAIMAN D., DILLMANN C., MAZZANTI E., FOULLEY J.L., LEVEZIEL H., CIANCI D. (1995a). Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphism permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *Journal Animal Science* 73: 3259-3268.

- JEANPIERRE M. (1987). A rapid method for purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res.*, 15: 9611.
- MAC HUGH D.E., LOFTUS R.T., CUNNINGHAM P., BRADLEY D.G. (1998). Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics*, 29: 333-340.
- PEELMAN L.J., MORTIAUX F., VAN ZEVEREN A., DANSERCOER A., MOMMENS G., COOPMAN F., BOUQUET Y., BURNY A., RENAUVILLE R., PORTETTELLE D. (1998). Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Animal Genetics*, 29: 161-167.
- STEFFEN P., EGGEN A., DIETZ A.B., WOMACK J.E., STRANZINGER G., FRIES R. (1993). Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Anim. Genet.*, 24: 121-124.
- VAIMAN D., MERCIER D., MOAZAMI-GOURDARZI K., EGGEN A., CIAMPOLINI R., LÉPINGLE A., VELMALA R., KAUKIEN J., VARVIO S.L., MARTIN P., AND LEVEZIEL H. (1994). A set of 99 cattle microsatellites: Characterization, synteny mapping and polymorphism. *Mamm. Genome*, 5: 288.

