

Analisi dei marcatori genetici uniparentali delle razze equine Haflinger e Norico

Introduzione

Nei mammiferi esistono due unici sistemi genetici non ricombinanti: il DNA mitocondriale (mtDNA), genoma extranucleare trasmesso solo per via materna, e la regione maschio-specifica del cromosoma Y (MSY). I marcatori uniparentali sono sistemi genetici ereditati senza andare incontro a fenomeni di ricombinazione, per questo motivo le variazioni nella sequenza mitocondriale e del cromosoma Y derivano soltanto dall'accumulo sequenziale di nuove mutazioni lungo linee di discendenza esclusivamente femminili (per l'mtDNA) o maschili (per l'MSY).

Nel tempo questo processo di differenziamento molecolare ha dato origine ad unità monofiletiche, chiamate cladi, o aplogruppi (HG), cioè gruppi di mtDNA o MSY che condividono una simile combinazione di mutazioni (aplotipo, HT) derivata per discesa da un antenato comune femminile o maschile, rispettivamente. Mappando queste linee genetiche nel tempo e nello spazio (approccio "filogeografico") è possibile ricostruire la storia demografica delle diverse popolazioni, definendone origine, espansione e modelli di dispersione. Nel caso degli animali domestici è possibile identificare sia le aree e le modalità di domesticazione, che i processi di formazione e diffusione delle attuali razze. Nell'ultimo decennio è stata definita la filogenesi mitocondriale del cavallo che ha permesso di individuare i maggiori aplogruppi che ebbero un ruolo nel processo di domesticazione (Achilli et al. 2012). In particolare, alcuni studi si sono concentrati sull'analisi della variabilità del DNA mitocondriale e del cromosoma Y (ChrY) di razze locali Italiane (Cardinali et al. 2016; Giontella et al. 2020; Lancioni et al. 2020), evidenziando importanti peculiarità che sembrano non aver subito l'influenza delle razze utilizzate per il miglioramento genetico nel corso della storia.

Il DNA mitocondriale equino è lungo 16,660 bp (paia di basi), di cui il 68% è codificante per proteine; la regione MSY equina invece è di circa 15Mb (Fig. 1).

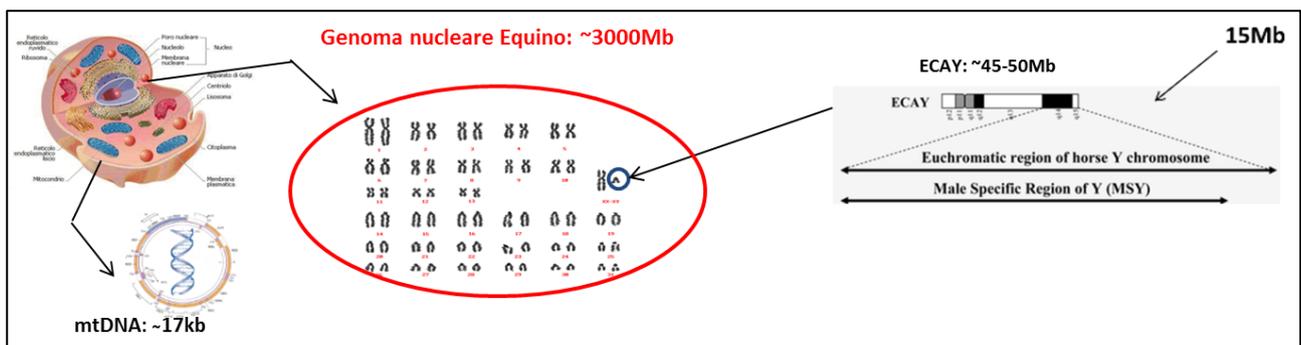


Figura 1. Rappresentazione schematica del genoma nucleare e mitocondriale del cavallo.

Materiali e metodi

Il DNA di 42 cavalli Haflinger e di 65 Norici è stato raccolto ed estratto presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Perugia (Centro di Ricerca sul Cavallo Sportivo). Le analisi del DNA mitocondriale sono state svolte presso il laboratorio di Genetica di Popolazione ed Evoluzione Molecolare (Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie dell'Università di Perugia) di cui fanno parte la Prof. Hovirag Lancioni (responsabile dell'unità di ricerca) e la Dott.ssa Irene Cardinali.

Lo studio ha previsto le seguenti fasi:

1. Estrazione del DNA da sangue.
2. Amplificazione PCR della regione di controllo del DNA mitocondriale (D-loop), che si estende dalla posizione nucleotidica 15469 alla 16660 e di 3 loci del ChrY.
3. Sequenziamento Sanger di circa 600bp del D-loop e di circa 1000bp della regione MSY.
4. Annotazione delle mutazioni rispetto ad una sequenza di riferimento e classificazione dei vari aplotipi in aplogruppi sulla base delle mutazioni condivise.

Risultati dell'analisi del DNA mitocondriale

Haflinger

Come si evince dalla tabella 1, tra i 42 campioni Haflinger sono stati individuati 23 aplotipi differenti (HTHaf01-HTHaf23). I campioni sono poi stati raggruppati in aplogruppi e, facendo riferimento alla nomenclatura pubblicata da Achilli et al. 2012, è stato possibile classificare i 42 Haflinger in 10 aplogruppi (A, B, C, G, I, L, N, O, Q, R) (Tab. 1).

Tabella 1. Classificazione in aplotipi e aplogruppi mitocondriali dei 42 cavalli Haflinger.

	Campione	Sesso	Codice Aplotipo	Aplogruppo
1	H1	F	HTHaf01	I
2	H2	F	HTHaf02	I
3	H3	F	HTHaf03	I
4	H4	F	HTHaf04	L
5	H5	F	HTHaf05	G
6	H6	F	HTHaf06	L
7	H7	F	HTHaf07	G
8	H8	F	HTHaf08	Q
9	H9	F	HTHaf06	L
10	H10	F	HTHaf09	B

11	H11	F	HTHaf08	Q
12	H12	F	HTHaf10	G
13	H13	F	HTHaf11	L
14	H14	F	HTHaf06	L
15	H15	F	HTHaf06	L
16	H16	F	HTHaf11	L
17	H17	F	HTHaf12	N
18	H18	F	HTHaf13	A
19	H19	F	HTHaf06	L
20	H20	F	HTHaf14	L
21	H21	F	HTHaf08	Q
22	H22	F	HTHaf08	Q
23	H23	F	HTHaf15	G
24	H25	F	HTHaf05	G
25	H26	F	HTHaf13	A
26	H27	F	HTHaf06	L
27	H28	F	HTHaf16	L
28	H29	F	HTHaf16	L
29	H31	F	HTHaf17	L
30	H32	F	HTHaf07	G
31	H33	F	HTHaf10	G
32	H34	F	HTHaf06	L
33	H35	F	HTHaf18	R
34	H36	F	HTHaf19	C
35	H37	F	HTHaf20	G
36	H38	F	HTHaf15	G
37	H39	F	HTHaf21	O
38	H40	F	HTHaf05	G
39	H41	F	HTHaf22	N
40	H42	F	HTHaf09	B
41	H43	F	HTHaf23	A
42	H44	F	HTHaf17	L

Il confronto delle sequenze ottenute in questo lavoro con quelle precedentemente pubblicate per le razze Italiane ha portato all'identificazione di 10 aplotipi unici (HTHaf03, HTHaf05, HTHaf08, HTHaf12, HTHaf14, HTHaf15, HTHaf16, HTHaf18, HTHaf20, HTHaf23), mai riscontrati nelle altre razze locali, e di 2 aplotipi condivisi solo con il Purosangue Arabo (HTHaf01) e con il Norico (HTHaf19).

Tra i 42 Haflinger su cui è stata condotta l'analisi dell'mtDNA, gli aplogruppi più rappresentati risultano essere L (35,71%) e G (23,81%) (Fig. 2).

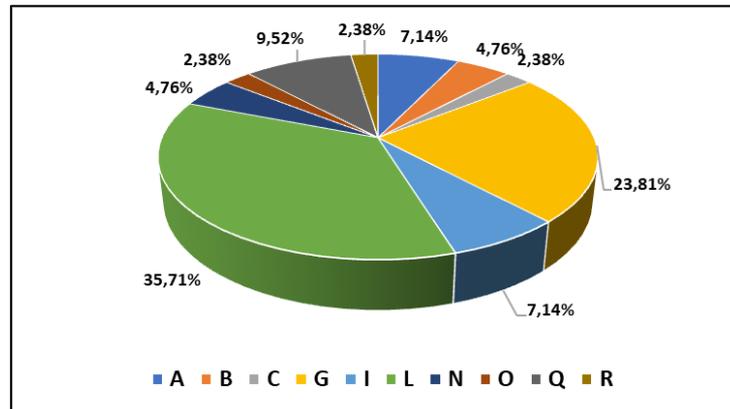


Figura 2. Frequenze degli aplogruppi mitocondriali in 42 cavalli Haflinger.

La network ottenuta dall'analisi degli aplotipi mostra le relazioni filogenetiche esistenti tra gli mtDNA dei 65 campioni (Fig. 3). I cerchietti colorati in verde rappresentano gli aplotipi corrispondenti ai campioni analizzati, la cui dimensione aumenta con il numero dei campioni che presentano lo stesso aplotipo. I nomi degli aplogruppi sono riportati in nero vicino al ramo corrispondente. L'asterisco indica la sequenza di riferimento (cerchio nero) utilizzata per l'annotazione degli aplotipi.

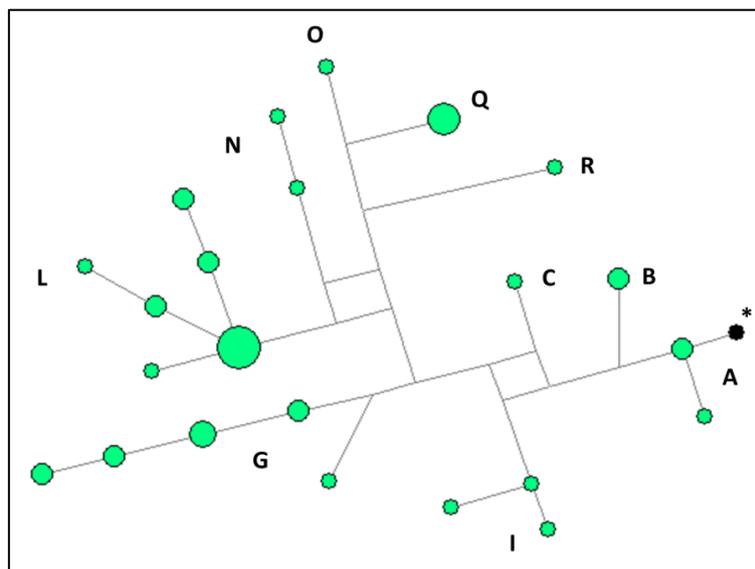


Figura 3. Analisi delle relazioni filogenetiche (Network) tra i 42 cavalli Haflinger.

Norico

L'analisi della regione di controllo del DNA mitocondriale dei 65 campioni Norici ha permesso di individuare ben 36 aplotipi differenti (HTNor01-HTNor36) e di assegnare ad ogni campione il rispettivo aplogruppo mitocondriale. I 65 Norici sono stati quindi classificati in 11 aplogruppi (A, B, C, E, G, I, L, M, N, O'P, Q) (Tab. 2).

Tabella 2. Classificazione in aplotipi e aplogruppi mitocondriali dei 65 cavalli Norici.

	Campione	Sesso	Codice Aplotipo	Aplogruppo
--	----------	-------	-----------------	------------

1	NK01	F	HTNor01	L
2	NK02	F	HTNor02	I
3	NK03	F	HTNor03	L
4	NK04	F	HTNor04	A
5	NK05	M	HTNor04	A
6	NK06	F	HTNor05	G
7	NK07	F	HTNor06	L
8	NK08	F	HTNor07	M
9	NK09	F	HTNor08	B
10	NK10	F	HTNor09	M
11	NK11	F	HTNor10	L
12	NK12	F	HTNor11	C
13	NK13	F	HTNor12	I
14	NK14	M	HTNor13	G
15	NK15	M	HTNor06	L
16	NK16	M	HTNor14	O'P
17	NK17	F	HTNor15	L
18	NK18	F	HTNor15	L
19	NK19	F	HTNor16	N
20	NK20	F	HTNor17	L
21	NK21	M	HTNor17	L
22	NK22	F	HTNor18	B
23	NK23	F	HTNor02	I
24	NK24	F	HTNor19	M
25	NK25	F	HTNor20	E
26	NK26	F	HTNor03	L
27	NK27	F	HTNor21	B
28	NK28	F	HTNor22	Q
29	NK29	F	HTNor23	I
30	NK30	F	HTNor19	M
31	NK31	F	HTNor19	M
32	NK32	F	HTNor17	L
33	NK33	F	HTNor03	L
34	NK34	F	HTNor13	G
35	NK35	F	HTNor24	I
36	NK36	F	HTNor10	L
37	NK37	F	HTNor25	L
38	NK38	F	HTNor26	M
39	NK39	F	HTNor27	A
40	NK40	F	HTNor26	M
41	NK41	F	HTNor28	G
42	NK42	F	HTNor22	Q
43	NK43	F	HTNor29	N

44	NK44	F	HTNor19	M
45	NK45	F	HTNor10	L
46	NK46	F	HTNor10	L
47	NK47	F	HTNor06	L
48	NK48	M	HTNor30	N
49	NK49	M	HTNor31	G
50	NK50	F	HTNor25	L
51	NK51	F	HTNor11	C
52	NK52	F	HTNor11	C
53	NK53	F	HTNor17	L
54	NK54	F	HTNor32	Q
55	NK55	F	HTNor25	L
56	NK56	F	HTNor03	L
57	NK57	F	HTNor29	N
58	NK58	F	HTNor33	A
59	NK59	F	HTNor19	M
60	NK60	F	HTNor34	O'P
61	NK61	F	HTNor03	L
62	NK70	F	HTNor35	B
63	NK71	F	HTNor36	I
64	NK72	F	HTNor35	B
65	NK73	F	HTNor11	C

Il confronto delle sequenze ottenute in questo lavoro con quelle precedentemente pubblicate per le razze Italiane ha portato all'identificazione di 7 aplotipi unici (HTNor22, HTNor23, HTNor26, HTNor27, HTNor31, HTNor32, HTNor34), mai riscontrati nelle altre razze locali, e di 2 aplotipi condivisi solo con Haflinger (HTNor11) e con il Cavallo da Tiro Pesante Rapido (HTNor36).

Tra i 65 Norici su cui è stata condotta l'analisi dell'mtDNA, gli aplogruppi più rappresentati risultano essere L (33,85%) e M (13,85%) (Fig. 4).

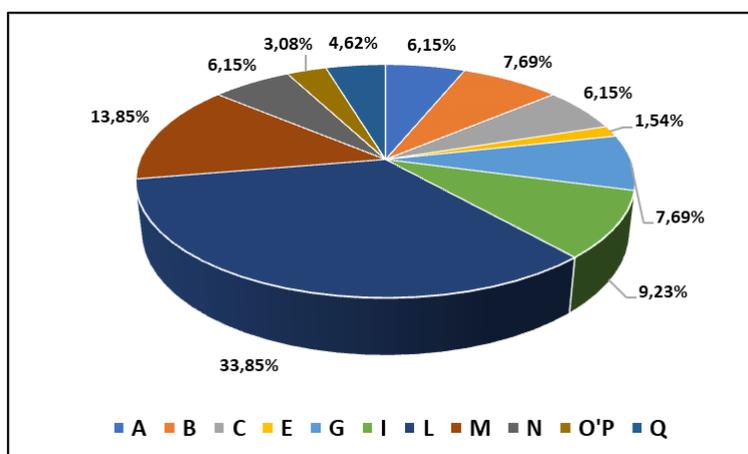


Figura 4. Frequenze degli aplogruppi mitocondriali in 65 cavalli Norici.

La network ottenuta dall'analisi degli aplotipi mostra le relazioni filogenetiche esistenti tra gli mtDNA dei 65 campioni (Fig. 5). I cerchietti colorati in giallo rappresentano gli aplotipi corrispondenti ai campioni analizzati, la cui dimensione aumenta con il numero dei campioni che presentano lo stesso aplotipo. I nomi degli aplogruppi sono riportati in nero vicino al ramo corrispondente. L'asterisco indica la sequenza di riferimento utilizzata per l'annotazione degli aplotipi.

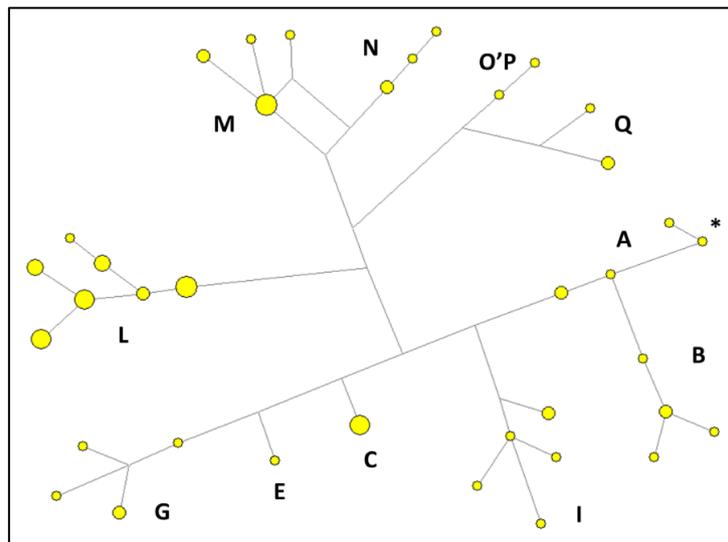


Figura 5. Analisi delle relazioni filogenetiche (Network) tra i 65 cavalli Norici.

Risultati dell'analisi del Cromosoma Y

Per l'analisi della regione maschio-specifica del cromosoma Y, abbiamo fatto riferimento ai loci individuati da Wallner et al. nel 2013. Questo gruppo di ricerca ha infatti osservato una forte influenza genetica degli stalloni provenienti dal Vicino Oriente sui cavalli Europei ed ha descritto sei aplotipi MSY (HT1, HT2, HT3, HT4, HT5, HT6) per i cavalli moderni. Tra questi, tre aplotipi risultano particolarmente comuni: HT1, che rappresenta l'aplotipo ancestrale; HT2, caratteristico dell'ondata Orientale; HT3, tipico del Purosangue Inglese (Wallner et al. 2013; Giontella et al. 2020; Cardinali et al. 2022). I 3 restanti aplotipi (HT4, HT5, HT6) derivano dall'aplotipo HT1 e sono stati riscontrati solo nelle razze nord-europee. In particolare, l'elevata frequenza degli aplotipi HT1 e HT2 sembra essere dovuta all'importazione di cavalli arabi portatori di questi aplotipi negli allevamenti dell'Europa centrale, mentre la frequenza di HT3 nei cavalli moderni è attribuibile all'uso intensivo del Purosangue Inglese nel miglioramento delle altre razze equine.

Tra i campioni Haflinger analizzati non c'erano esemplari femmina, quindi non è stata condotta l'analisi sul Cromosoma Y. Ad ogni modo, alcune pubblicazioni riportano lo stesso aplotipo HT1 per i cavalli Haflinger provenienti dall'Europa Centrale (Wallner et al. 2013; Kreutzmann et al. 2014). L'analisi di 3 loci dell'MSY dei 7 stalloni Norici, invece, ci ha permesso di osservare che essi presentano tutti lo stesso aplotipo HT1.

Un recente lavoro riguardante l'analisi della regione maschio-specifica del cromosoma Y (MSY) di molte razze equine moderne ha affermato che i cavalli appartenenti alle razze Haflinger e Norico, tutti campionati

in Italia, appartengono ad un aplogruppo della linea maschile rappresentato da stalloni Arabi e da razze di cavalli da tiro (Felkel et al. 2018).

Conclusioni

L'analisi del DNA mitocondriale ha evidenziato un totale di 17 aplotipi unici (10 tra i cavalli Haflinger e 7 nei Norici) mai riscontrati nelle altre razze locali Italiane precedentemente analizzate. Tutti i campioni sono poi stati classificati in aplogruppi, mostrando una buona variabilità e delle caratteristiche peculiari nelle due razze. I dati ottenuti da una piccola porzione (D-loop) rappresentano uno step preliminare che permette di effettuare una prima analisi della variabilità genetica mitocondriale e quindi la selezione dei campioni su cui fare l'analisi dell'intero mitogenoma, al fine di conoscere la sequenza completa e, in particolare, caratterizzare gli aplotipi unici al massimo livello di risoluzione per l'mtDNA.

L'analisi dei 3 loci del cromosoma Y invece ha delineato una mancanza di variabilità genetica tra gli stalloni Norici analizzati. Al fine di confermare questo dato e poter fare un'analisi comparativa tra i dati riguardanti le linee materne e quelli relativi alla controparte maschile, risulta comunque necessario estendere il campionamento anche agli stalloni Haflinger ed ampliare il numero di loci MSY da analizzare.

Perugia, 15 febbraio 2024

Il Direttore

Prof. Maurizio Silvestrelli
