



# Atti del 6° Convegno Nazionale di Archeozoologia

**Centro visitatori del Parco dell'Orecchiella**

**21-24 maggio 2009**

***San Romano in Garfagnana - Lucca***

a cura di

Jacopo De Grossi Mazzorin

Daniela Saccà

Carlo Tozzi

MARIA GARGANI<sup>1</sup>, LORRAINE PARISSET<sup>1</sup>, FEDERICA GABBIANELLI<sup>1</sup>, ELISABETTA DE MINICIS<sup>2</sup>, ALESSIO VALENTINI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Produzioni Animali, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze del Mondo Antico, Università degli Studi della

Tuscia, Viterbo

## **Analisi di marcatori microsatelliti in resti bovini medievali provenienti dal sito di Ferento (VT)**

### *Analysis of microsatellite markers in medieval cattle remains from Ferento (VT)*

Riassunto - L'analisi del DNA antico, attraverso l'uso di marcatori molecolari, può essere un ottimo strumento per interpretare la struttura genetica di popolazioni di animali allevati in tempi storici, la loro origine geografica, la demografia. Tuttavia marcatori quali i 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.

Lo scopo di questo lavoro è stato identificare, a partire dai microsatelliti utilizzati per lo studio di popolazioni bovine (*Bos taurus*) moderne, alcuni *loci* che possano essere utilizzati in fossili bovini. Il DNA antico è stato estratto da 13 campioni di ossa bovine risalenti al X secolo D.C. provenienti da Ferento. Sono stati selezionati e analizzati tramite PCR 11 loci microsatelliti. Degli 11 microsatelliti testati 8 hanno amplificato con successo. I nostri risultati hanno dimostrato la possibilità di usare questo tipo di marcatori per lo studio di popolazioni antiche bovine. I dati preliminari hanno fornito un primo elenco di microsatelliti compatibili con il livello di degradazione dell'aDNA. Inoltre l'analisi dei microsatelliti potrebbe essere utile per attribuire resti di animali prelevati negli stessi siti di ritrovamento a specifici individui.

*Summary - The analysis of ancient DNA through molecular markers is a valuable tool to infer population structure of ancient animal populations, including their geographical origin, demography and the similarity to modern breeds. However, markers such as microsatellites are harbored in nuclear DNA, that is scarce and highly degraded in ancient remains. The aim of this study was to identify some loci that can be used in cattle remains on medieval samples from microsatellite available for the study of modern cattle (*Bos taurus*) populations. The ancient DNA was extracted from 13 cattle bones dated to the 10th cent. CE from Ferento. A total of 11 microsatellites were selected and analyzed by PCR. A successful amplification was obtained using 8 of the selected microsatellites. We can demonstrate the feasibility of using microsatellites for the study of ancient cattle. Preliminary data have provided a list of 8 markers consistent with degradation of aDNA. This analysis can be useful not only in studying population structure but also in attributing remains to specific individuals.*

Parole chiave: Microsatelliti, DNA antico, *Bos taurus*, Ferento.

Key words: Microsatellite, ancient DNA, *Bos taurus*, Ferento.

## **INTRODUZIONE**

Gli studi condotti sul DNA antico sono in gran parte basati sulle analisi del DNA mitocondriale (mtDNA). Recentemente attraverso le tecniche di sequenziamento di nuova generazione è stato possibile sequenziare l'intero genoma mitocondriale di due reperti di *Bos primigenius*: il primo risalente al mesolitico e proveniente dall'Inghilterra (Edwards *et al.* 2010), il secondo ritrovato in un sito archeologico del centro Italia (Lari *et al.* 2011). Il DNA nucleare invece è stato poco sfruttato per lo studio del DNA antico, in quanto è presente in un minor numero di copie e, per tale ragione, la probabilità di ritrovarlo in campioni antichi e degradati è scarsa. Uno dei primi studi che ha dimostrato la possibilità di ottenere sequenze nucleari in singola copia da materiale antico è stato condotto da Huynen e collaboratori nel 2003. Tra i marcatori nucleari, i più informativi sono sicuramente i microsatelliti. Questi ultimi sono stati ad esempio utilizzati per l'identificazione della famiglia dei

Romanov a partire da alcuni reperti ossei (Gill *et al.* 1994). L'elevato grado di polimorfismo rende i microsatelliti degli ottimi marcatori per lo studio della struttura delle popolazioni di animali antichi, rendendo possibile ottenere informazioni sulla demografia, la provenienza geografica, la migrazione e la somiglianza con le razze moderne. Nel 2003 il gruppo di Edwards ha dimostrato la possibilità di utilizzare marcatori microsatelliti su reperti bovini rinvenuti a Dublino e risalenti al X secolo. In questo studio abbiamo analizzato la possibilità di individuare nuovi marcatori microsatelliti sfruttati di routine nelle popolazioni moderne da poter utilizzare in resti di animali allevati in tempi storici. Questo potrà rendere possibile paragonare le informazioni ottenute sul materiale fossile con le popolazioni attuali. Inoltre abbiamo valutato la possibilità di usare i microsatelliti, per l'identificazione degli animali. Infatti, ogni singolo individuo è caratterizzato da un genotipo ben definito per ogni singolo microsatellite analizzato.

Uno dei principali problemi nell'analisi di reperti antichi è la difficoltà di amplificazione dovuta alla frammentazione del DNA; frammenti troppo lunghi, infatti, non potranno essere amplificati se il DNA di partenza è degradato e frammentato (Anderung *et al.* 2007). A tal fine abbiamo selezionato microsatelliti con una lunghezza allelica che consente l'analisi di DNA degradato. I loci sono stati analizzati su resti di ossa bovine risalenti al medioevo (X secolo DC) provenienti da Ferento, un sito archeologico situato sulla collina di Pianicara (Viterbo).

## MATERIALI E METODI

### Estrazione DNA

Sono stati analizzati 13 campioni di ossa bovine (*Bos taurus*) risalenti all'epoca medioevale. I reperti sono stati prelevati dal sito e portati nel nostro laboratorio dedicato esclusivamente all'analisi del DNA antico. Da ciascun osso sono stati ottenuti circa 0.5 g di polvere e si è proceduto alla estrazione del DNA seguendo il protocollo di Yang *et al.* (1998). In ogni estrazione è stato incluso un controllo negativo. Il DNA estratto e i controlli sono stati successivamente quantificati tramite il DTX Multimode Detector 880 (Beckman) utilizzando il metodo Picogreen (Quant-iT PicoGreen, Invitrogen).

### Scelta dei marcatori molecolari

Bovmap è un database pubblico del genoma bovino in cui sono presenti loci microsatelliti che vengono utilizzati nello studio delle popolazioni moderne. Da tale database sono stati selezionati 11 loci con una lunghezza inferiore a 160 bp (Tab.1) e analizzati sui 13 campioni mediante PCR (reazione a catena della polimerasi). Nello studio del DNA antico, a causa della scarsa quantità di DNA, è necessario effettuare due cicli di amplificazione successivi per ottenere una quantità di prodotto analizzabile (nested PCR), riamplicando il prodotto ottenuto dalla prima PCR nelle stesse condizioni dopo purificazione mediante ExoSap-IT (USB Corporation). Un controllo negativo è stato incluso in ogni reazione. Le reazioni di PCR sono state condotte in un volume finale di 20ul contenente 10ng di DNA, 1x buffer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200uM dNTPs, 0.05uM di ciascun primer marcato (Proligo), 0.2 unità di Taq Polimerasi (Bio-x-act short Bionline), usando il seguente programma: un ciclo a 95°C per 5 minuti, seguiti da 30 cicli composti da 30 secondi a 95°C, 30 secondi alla temperatura di annealing, 1 minuto a 72°C, seguiti da un ciclo a 72°C per 5 minuti. I prodotti di PCR sono stati analizzati tramite elettroforesi capillare mediante il sequenziatore CEQ8800 Beckman. Il campione da caricare è stato in un volume totale di 40ul contenente 38.7ul SLS, 0.3ul standard400 (CEQ 400) e 1ul prodotto di PCR. Lo standard (CEQ 400) di peso molecolare noto, è formato da un insieme di frammenti di dimensione conosciuta

(compresa tra 50 e 400 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.

### Autenticazione del DNA

Per poter essere sicuri di effettuare una corretta analisi si deve far fronte a un problema fondamentale, quello delle contaminazioni con DNA esogeno. Tale fattore è praticamente sempre presente durante questi tipi di studi, dallo scavo del campione fino a tutta la fase sperimentale molecolare e può essere causato sia da microorganismi del suolo, da DNA presente nel laboratorio (Leonard *et al.* 2006), ma soprattutto dal DNA umano dei vari operatori che vengono a contatto per molteplici motivi con il reperto in esame. Al fine di autenticare i risultati ottenuti, sono state prese tutte le precauzioni per limitare le contaminazioni durante le diverse fasi dello studio come suggerito da Cooper e Poinar nel 2000. 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 (ad eccezione dei campioni M6, M7, M8, M9, la cui seconda estrazione è in corso), e per ognuna sono state effettuate due reazioni di PCR. Infine tutte le PCR e le estrazioni contenevano controlli negativi per poter individuare eventuali contaminazioni. Ogni tre campioni estratti è stato incluso un controllo negativo in cui erano presenti tutti i reagenti esclusa la polvere di osso. Per quanto riguarda le PCR in ogni reazione è stato

Locus	BTA	Dimensioni alleliche
CSRM60	10	94-104
BMS1747	14	85-101
HEL1	15	103-113
BMS4016	1	137-149
INRA005	12	140-146
BL1134	10	107-117
BMS2519	2	112-130
BMS4012	1	107-115
MM12	9	101-154
INRA035	10	100-124
TGLA227	18	75-105

Tab. 1. Marcatori microsatelliti selezionati dal database BovMap ([www.marc.usda.gov/](http://www.marc.usda.gov/)). BTA= cromosoma bovino.

incluso un controllo negativo per un totale di tre controlli per microsatellite amplificato.

## RISULTATI

È stato estratto con successo DNA da tutti i campioni presi in esame. La resa di DNA varia da un minimo di 450ng di DNA (M9) ad un massimo di 19500ng/g (M4) per ogni grammo di polvere d'osso (Tab. 2). Tutti i bianchi di estrazione nella lettura del picogreen sono risultati negativi, indicando l'assenza di contaminazioni.

Degli 11 microsatelliti testati, 8 hanno amplificato con successo in almeno 4 campioni, mentre gli altri 3 non hanno dato amplificazioni positive e per questo sono stati scartati (Tab. 3). In totale sono state effettuate 388 amplificazioni con una media di 48 PCR per *locus*. Tutti i di PCR nella lettura del picogreen sono risultati negativi, indicando l'assenza di contaminazioni.

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. In tabella 3 è riportato il numero di amplificazioni e il tasso di amplificazioni positive per ogni *locus*. I *loci* BMS1747 e BL1134 presentano il più alto numero di amplificazioni positive (50%), mentre BMS4016 e INRA005 il tasso di amplificazione più basso (10%).

In tabella 4 sono riportate le lunghezze alleliche di ogni campione per ciascuno degli otto microsatelliti che hanno

amplificato con successo. Si può notare che i campioni hanno diversi profili allelici per ogni singolo microsatellite analizzato. Questo risultato potrebbe darci indicazioni sul fatto che i reperti ossei appartengano ad individui diversi. La degradazione del DNA antico, tuttavia, rende difficile l'attribuzione dei reperti ossei a specifici individui in quanto nel processo di amplificazione si possono ottenere falsi profili allelici. Per questo motivo abbiamo considerato solo i dati provenienti da estrazioni e amplificazioni indipendenti.

## CONCLUSIONE

In questo studio sono stati analizzati 13 reperti ossei bovini risalenti al medioevo e provenienti da Ferento. Lo scopo di questo lavoro è stato di identificare *loci* microsatelliti, presenti nei database dei bovini moderni, da utilizzare in resti bovini.

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 dedicato (laboratorio del DNA antico, Dipartimento Produzioni Animali, Università degli studi della Tuscia), sia negli esperimenti di estrazione del DNA, sia nelle reazioni di PCR sono stati sempre inclusi numerosi controlli negativi. Il primo importante risultato

Campione	M1	M2	M4	M5	M6	M7	M8	M9	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11
1° estrazione	3900	4800	19500	9300	4800	900	1860	450	3000	4500	6000	2000	1200
2° estrazione	900	2400	800	500	-	-	-	-	2000	3000	2000	1000	800

Tab. 2. Resa di estrazione del DNA espressa in ng per grammo di polvere di osso. Il DNA di ogni campione è stato estratto due volte (ad eccezione dei campioni M6, M7, M8, M9).

Locus	CSRM60	BMS1747	HEL1	BMS4016	INRA005	BL1143	BMS2519	BMS4012
Num. per	85	64	48	54	39	35	37	26
% per positive	20	50	30	10	10	50	30	20

Tab. 3. Numero di PCR e tasso di amplificazione per ogni *locus*.

Campione	CSRM60	HEL1	BMS1747	BMS4016	INRA005	BMS4012	BMS2519	BL1134
M1	104	n.a	86	137	n.a	107	104/112	n.a
M2	106	107	100	149	142	115	124	117
M4	94	n.a	86	n.a	144	n.a	126	117
M5	100/104	105/113	96/100	137/149	144/146	113/115	104	111/117
M6	n.a	n.a	90	n.a	n.a	n.a	126	n.a
M7	n.a	107/113	100	n.a	n.a	107/115	112/130	117
M8	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	115	n.a	n.a
M9	n.a	n.a	100	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Q7	104	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	130	n.a
Q8	100	113	98	n.a	140	115	130	n.a
Q9	94/104	113	100	141	n.a	n.a	124/126	111
Q10	102	105	88	n.a	n.a	n.a	124/134	111/117
Q11	n.a	n.a	100	n.a	n.a	n.a	112	n.a

Tab. 4. Grandezze alleliche espresse in paia di basi di ogni campione per ciascuno dei microsatelliti che hanno amplificato con successo.

ottenuto è stato quello di aver ottenuto DNA da tutti i campioni presi in esame con una resa che varia da 450 a 19500 ng DNA per ogni grammo di polvere di osso.

Per quanto concerne le PCR abbiamo ottenuto dei risultati positivi per 8 degli 11 microsatelliti testati. 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. Questi dati preliminari hanno dimostrato la possibilità di usare i marcatori microsatelliti per lo studio delle popolazioni antiche di animali domestici quali i bovini, che possono essere confrontate con le popolazioni moderne.

Abbiamo fornito quindi un primo elenco di microsatelliti bovini utilizzabili su reperti antichi (per quanto dimostrato, almeno fino a 1000 anni fa).

#### BIBLIOGRAFIA

- Anderung C., Persson P., Bouwman A., Elburg R., Götherström 2007. A. Fishing for ancient DNA. *Forensic Science International Genetics*, 2: 104-107.
- Cooper A., Poinar H. 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science*, 289: 1139.
- Edwards C.J., Magee D.A., Park S.D.E., McGettigan P.A., Lohan A.J., Murphy A., Finlay E., Shapiro B., Chamberlain A.T., Richards M.B., Bradley D.G., Loftus B.J., MacHugh D.E. 2010. A Complete Mitochondrial Genome Sequence from a Mesolithic Wild Aurochs (*Bos primigenius*). *PLoS ONE*, 5: e9255.
- 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., Bradley D.G. 2003. Feasibility and utility of microsatellite markers in archaeological cattle remains from a Viking Age settlement in Dublin. *Animal Genetics*, 34: 410-416.
- Gill P., Pavel L., Ivanov P.L., Kimpton C., Piercy R., Benson N., Tully G., Evett I., Hagelberg E., Sullivan K. 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics*, 6: 130-135.
- Huynen L., Millar C.D., Scofield R.P., Lambert D.M. 2003. Nuclear DNA sequences detect species limits in ancient moa. *Nature*, 425: 175-178.
- Lari M., Rizzi E., Mona S., Corti G., Catalano G., Chen K., Vernesi C., Larson G., Boscato P., De Bellis G., Cooper A., Caramelli D., Bertorelle G. 2011. The complete mitochondrial genome of an 11,450-year-old aurochs (*Bos primigenius*) from central Italy. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 32.
- Leonard J.A., Shanks O., Hofreiter M., Kreuz E., Hodges L., Ream W., Wayne R.K., Fleischer R.C. 2006. Animal DNA in PCR reagents plagues ancient DNA research. *Journal of Archaeological Science*, 34: 1361-1366.
- Yang D.Y., Eng B., Wayne J.S., Dudar J.C., Saunders S.R. 1998. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *American Journal of Physical Anthropology*, 105: 539-543.