Università degli Studi di Milano
Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano
Istituto di Zootecnica
via Celoria 10 - Milano

ANALISI DEL DNA: APPLICAZIONI PER LA SELEZIONE DEL CANE DI RAZZA

Dott. Michele Polli

SELEZIONE DEL CANE DI RAZZA:

GENETICA MOLECOLARE

APPLICAZIONE DELLE TECNICHE DEL DNA ALLA SPECIE CANINA

Applicazioni principali:

- **CONTROLLO GENETICO DELLA PARENTELA**
- **STUDIO DELLA VARIABILITA' GENETICA**
- **STUDIO DELL' EREDITA' PATOLOGICA E SELEZIONE PER CARATTERI MORFOLOGICI DI INTERESSE**

CONTROLLO GENETICO DELLA PARENTELA NEL CANE

Valorizzazione del libro genealogico

ANALISI DEI MICROSATELLITI A LIVELLO DEL DNA

SEQUENZE DI RIPETIZIONI CONTIGUE

DINUCLEOTIDI	$(CA)_2$
TRINUCLEOTIDI	$(GAT)_3$
TETRANUCLEOTIDI	$(GAAA)_4$

- FREQUENZA E POLIMORFISMO
- SI TRASMETTONO IN MODO MENDELIANO

MICROSATELLITE

ripetizione: adenina e citosina

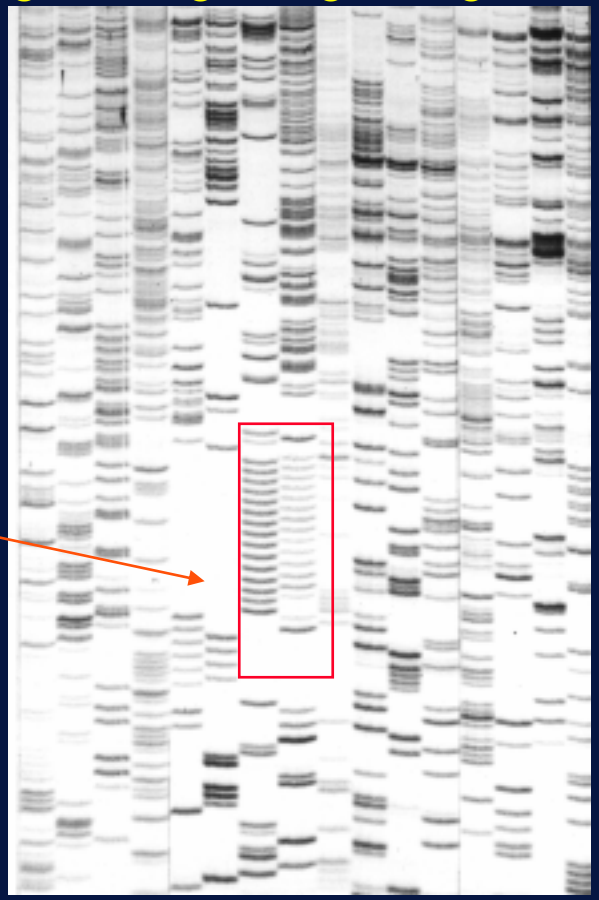
acacacacacacacacacacacacacac

dinucleotide :$(ac)_{15}$

Sequenziamento
con isotopi radioattivi

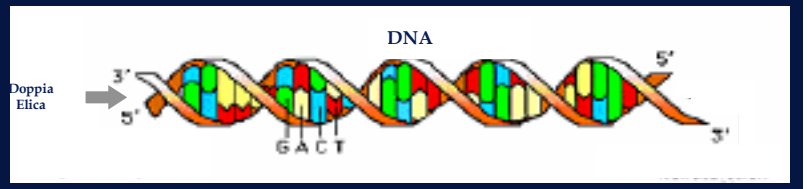
a = adenina
c = citosina
g = guanina
t = timina

g t a c g t a c g t a c g t a c



1) ESTRAZIONE DEL DNA

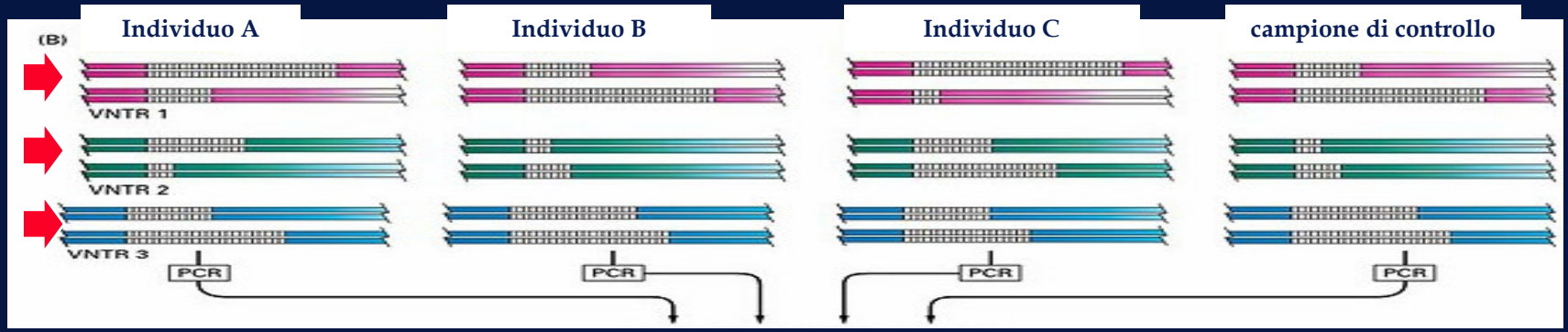
Sangue
Peli
Seme



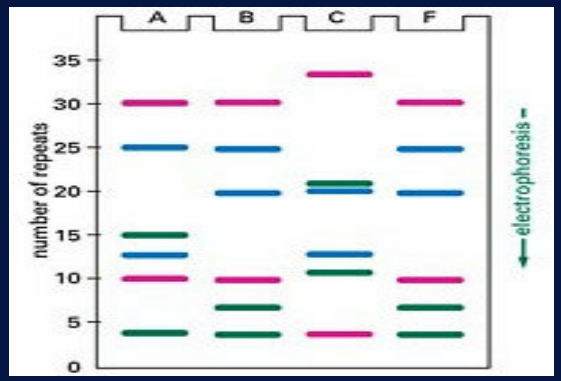
2) PCR

Polymerase Chain Reaction

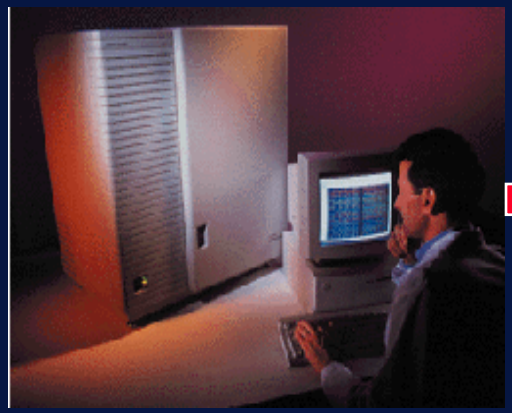
3 paia di cromosomi omologhi



3) ELETTROFORESI



Sequenziatore Automatico



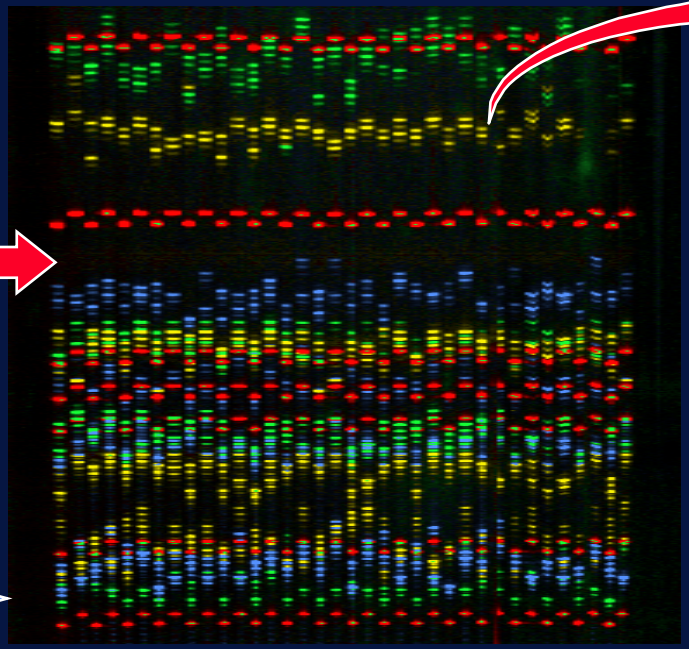
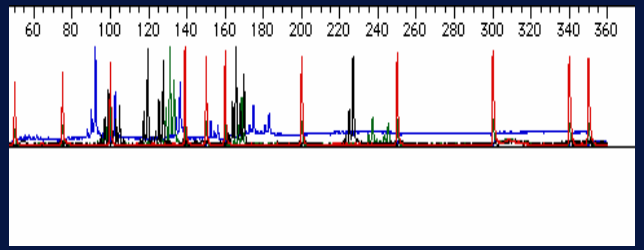
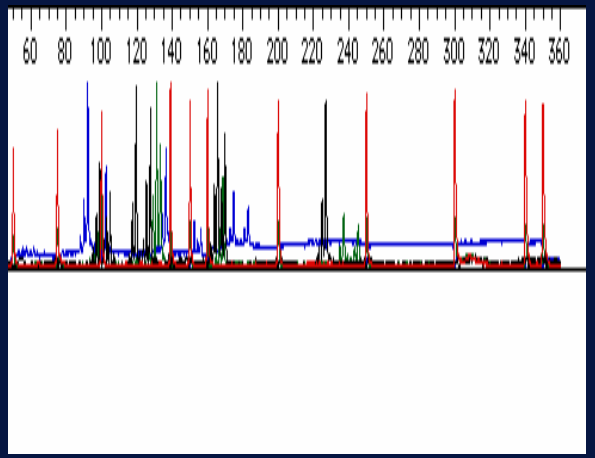


Immagine Computerizzata
dell' elettroforesi

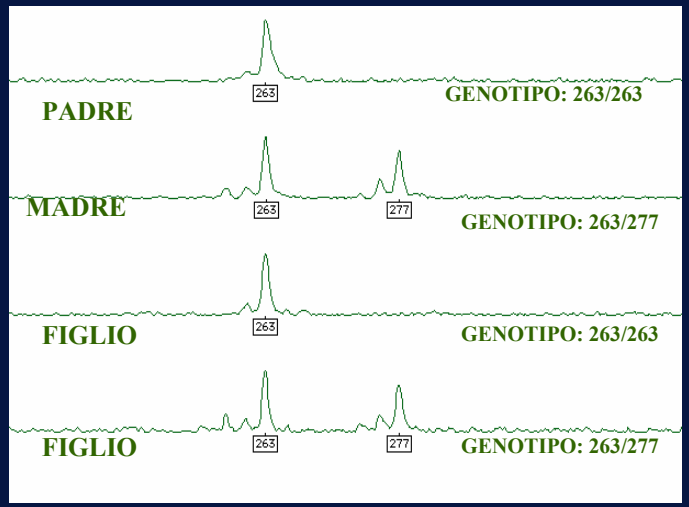
Elettroferogramma
di un campione con 12 microsatelliti

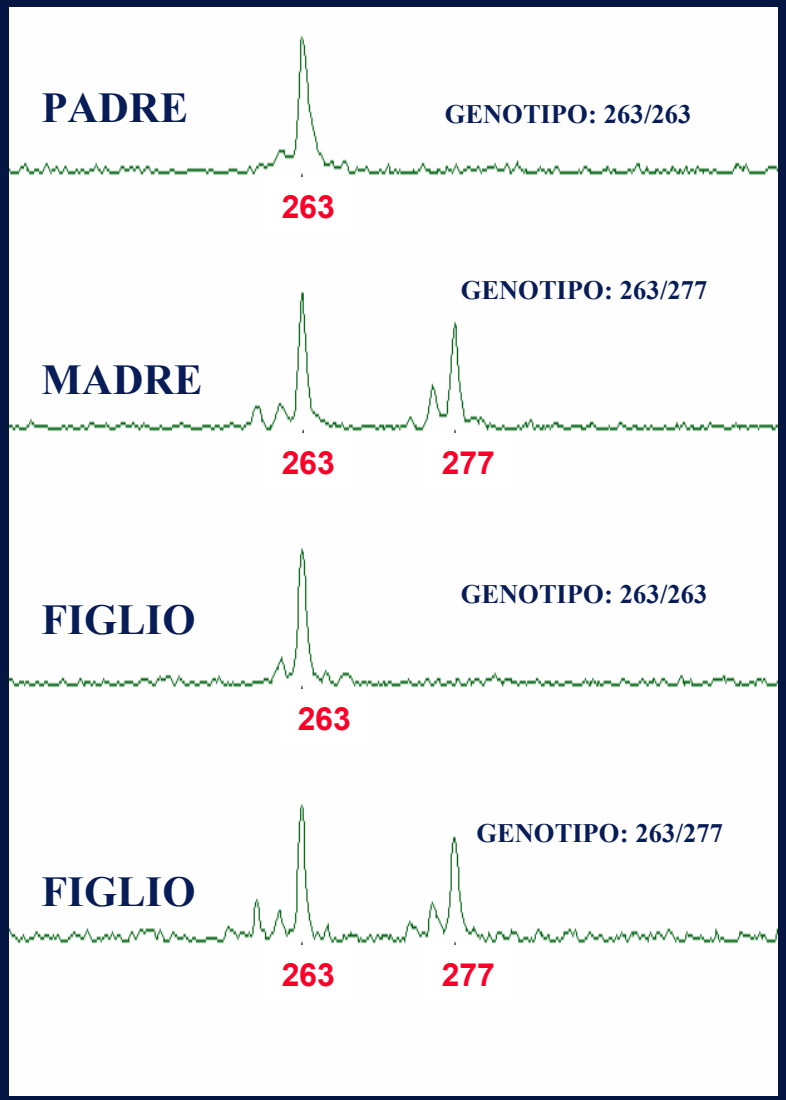




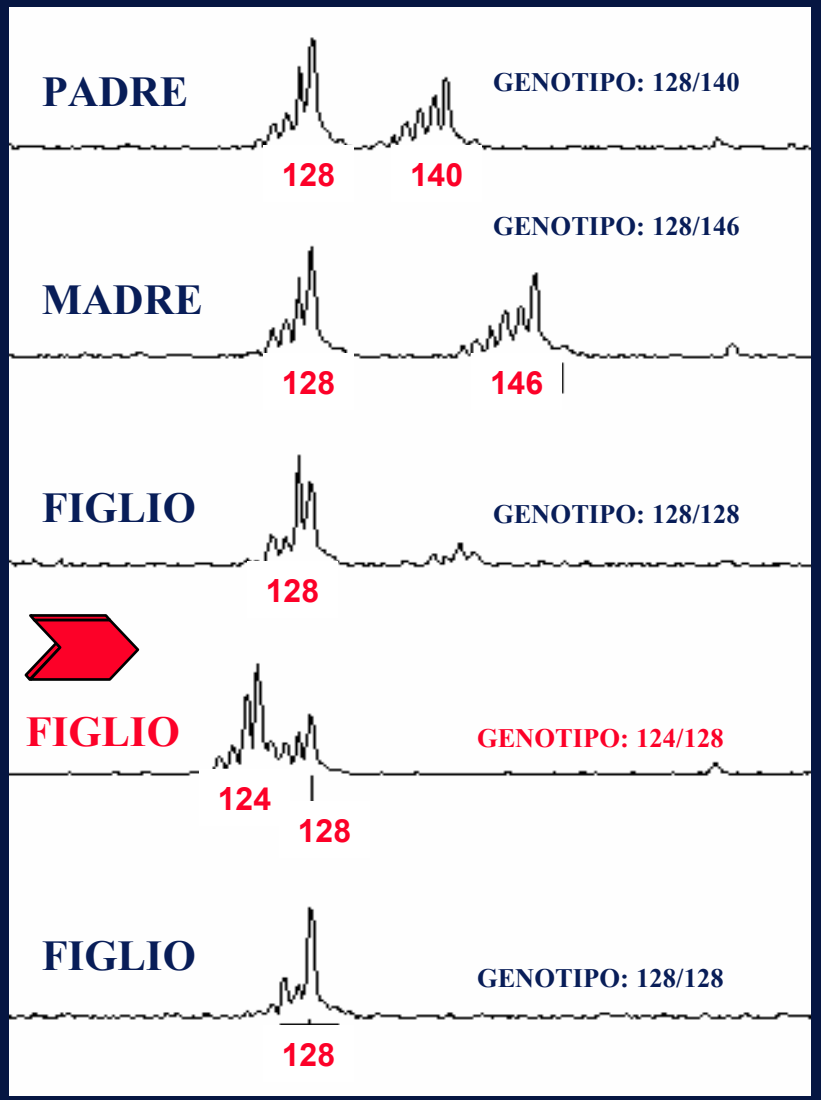
Profilo genetico di un campione

DIAGNOSI POSITIVA

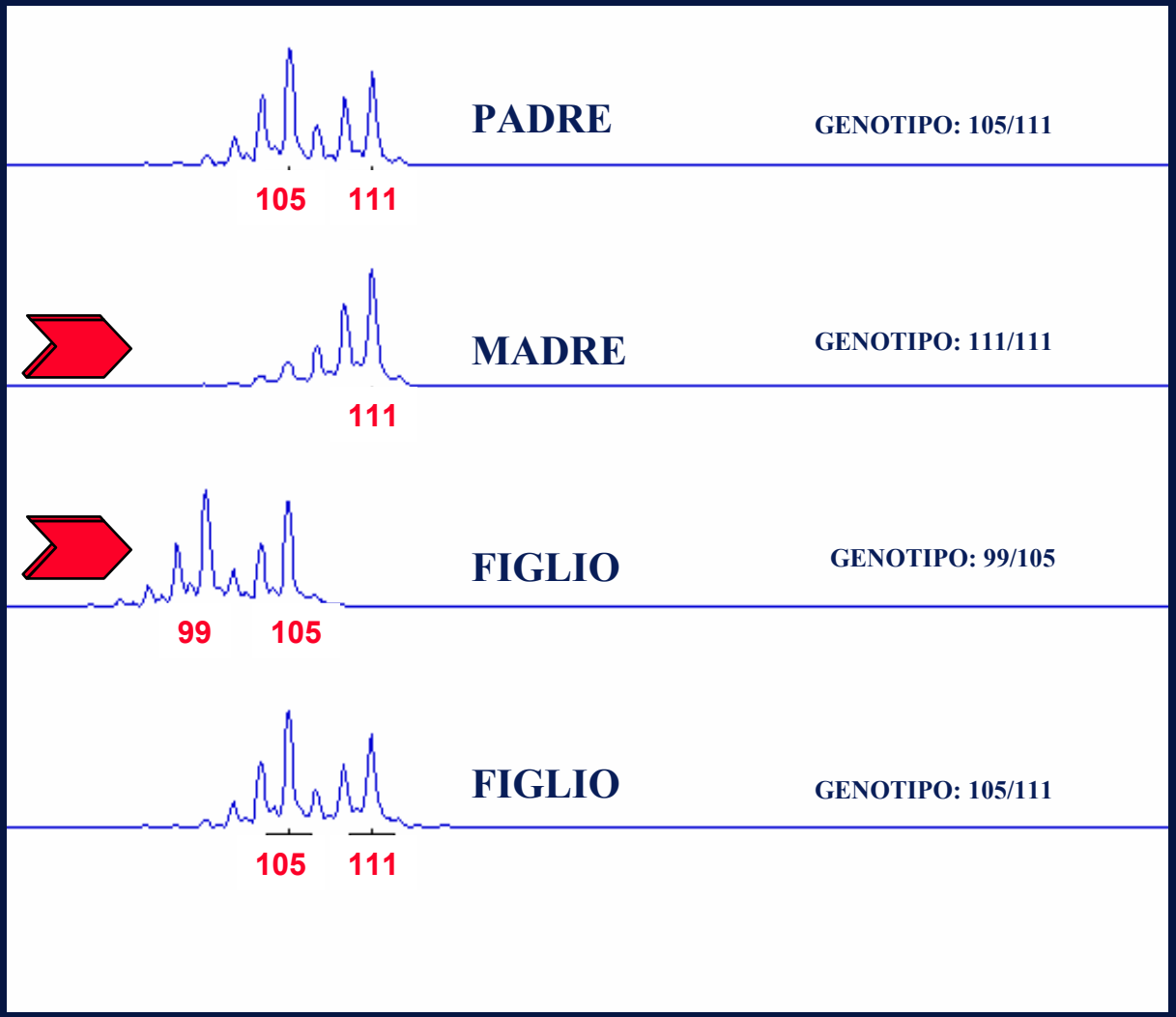




DIAGNOSI POSITIVA



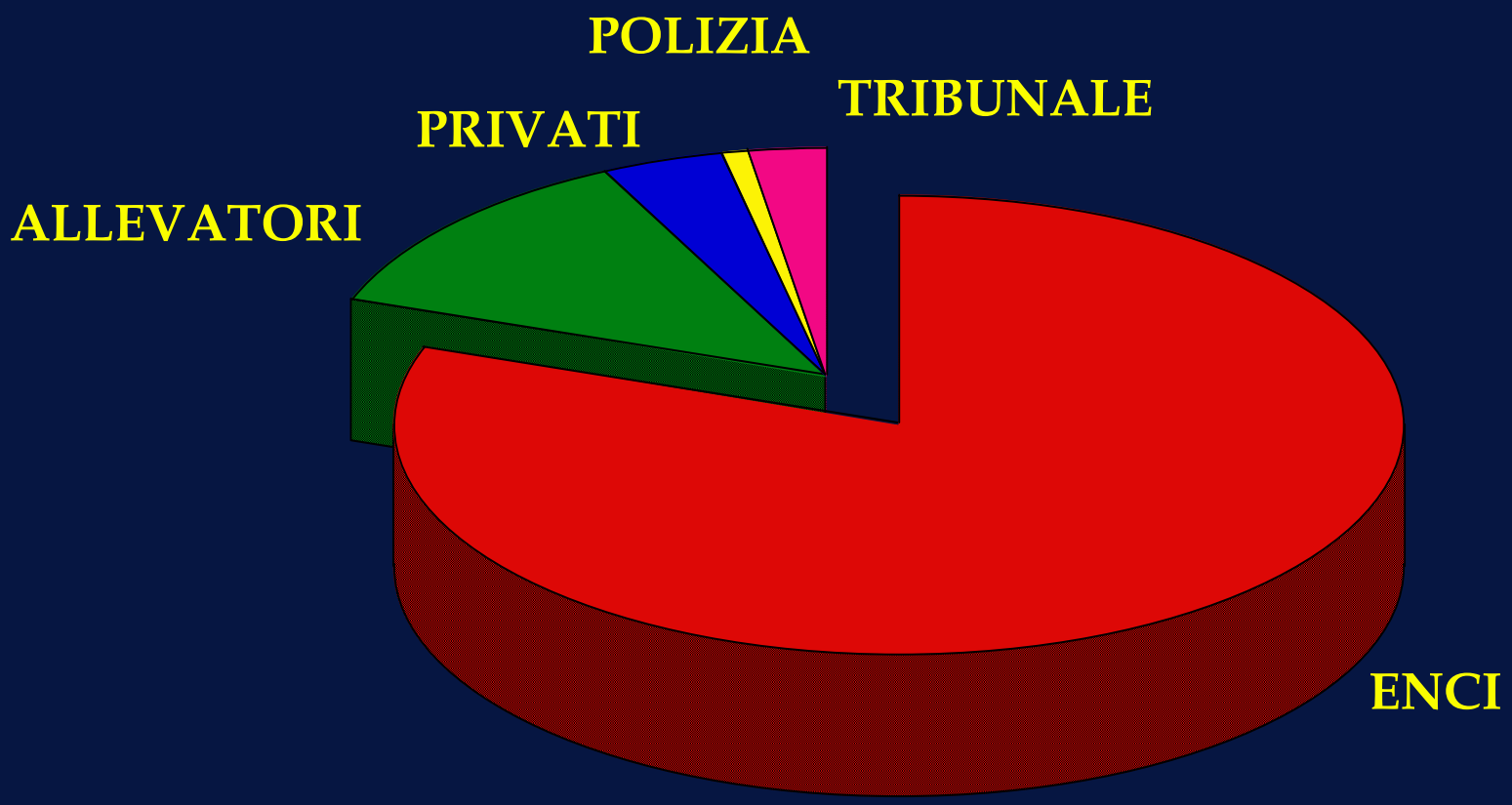
DIAGNOSI NEGATIVA



DIAGNOSI NEGATIVA

ISTITUTO DI ZOOTECNICA 1998 - 2000

CONTROLLO DELLA PARENTELA



DIAGNOSI DI PARENTELA PER ENCI

106 RICHIESTE anno 2000

(controllo di 106 gruppi famigliari)

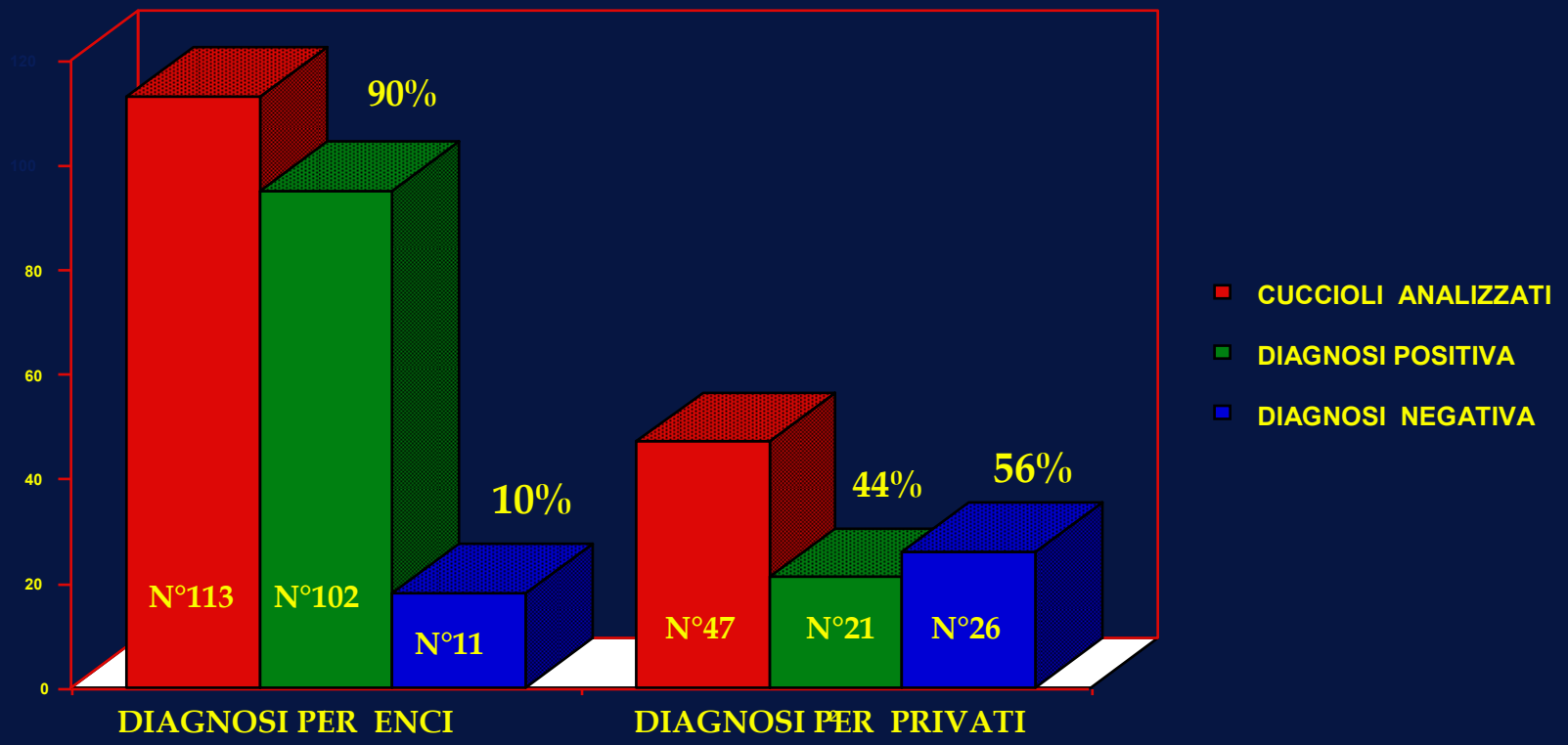
Per vizi di forma nell'iscrizione delle cucciolate

Contestazioni e denunce di alcuni allevatori

- **78 DIAGNOSI NON ESEGUITE**
  - I cani non sono stati sottoposti al test del DNA e quindi non sono stati iscritti al libro genealogico
    - Costi elevati ?
    - Scetticismo e delusione ?
    - Difficoltà logistiche ?
    - disinformazione ?
    - dubbio sull'effettiva parentela ?

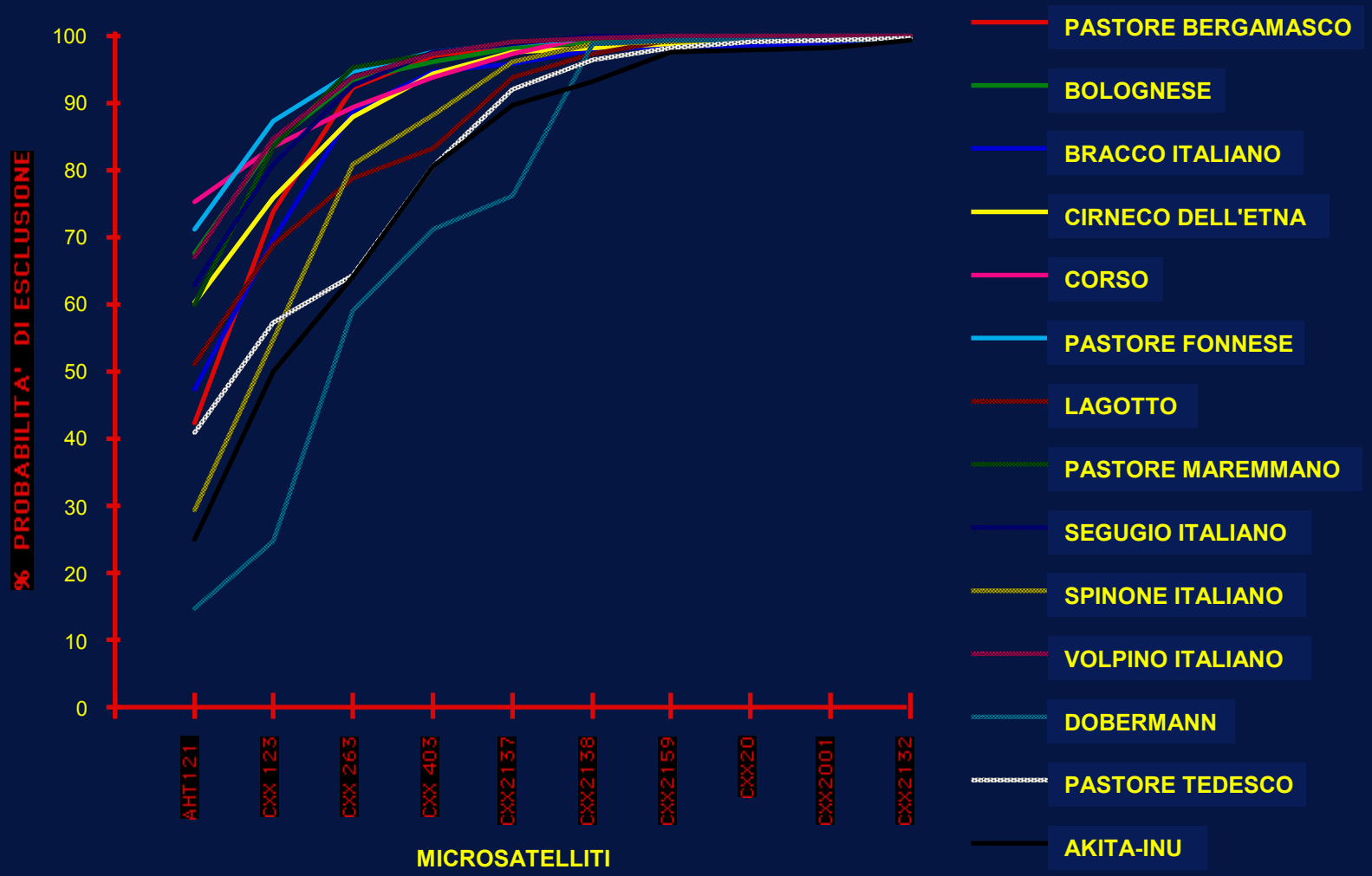
- **28 DIAGNOSI ESEGUITE**
  - I cani sono stati sottoposti al test del DNA e quindi sono stati iscritti al libro genealogico
    - Prelievi ematici presso
      - Università
      - Asl
      - Liberi Professionisti
    - Controllo del Tatuaggio o microchip
    - Certificazione del Veterinario e autocertificazione dell'allevatore

	NUMERO SOGGETTI ANALIZZATI PADRE- MADRE- CUCCIOLI	CUCCIOLI ANALIZZATI	DIAGNOSI POSITIVA	%	DIAGNOSI NEGATIVA	%
ENCI	179	113	102	90%	11	10%
PRIVATI	80	47	21	44%	26	56%
TOTALE	259	160	**123**	**77%**	**37**	**23%**



PROBABILITA' DI ESCLUSIONE DELLA PARENTELA ERRATA: EFFETTO CUMULATIVO

Aumentando il numero dei microsatelliti analizzati aumenta la probabilità di esclusione di una parentela errata

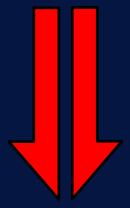


CON IL SISTEMA DEI MICROSATELLITI PER IL CONTROLLO DELLA PARENTELA

- **LA DIAGNOSI NEGATIVA DI PARENTELA E' SICURA AL 100 %**

- **L' ATTRIBUZIONE DI PARENTELA E' IN TERMINI PROBABILISTICI ED E' IN RELAZIONE AL NUMERO DI MICROSATELLITI ANALIZZATI**

- ISTITUTO DI ZOOTECNICA:
  - **10 Microsatelliti di base (tra più informativi)**
  - **12 Microsatelliti di riserva**



- **L' attribuzione della parentela in tutte le principali razze esaminate è del 99,9 %**

BIODIVERSITA' NELLA SPECIE CANINA

Studio delle relazioni genetiche e della variabilità genetica mediante microsatelliti

Obiettivi:
- Distanze genetiche e relazioni genetiche tra razze canine e altri canidi
- Polimorfismo (variabilità genetica)
- Consanguineità

Metodo:
- Microsatelliti del DNA
- Analisi del DNA di soggetti non imparentati in seconda generazione

1) Razze Italiane:

- Pastore Bergamasco
- Bolognese
- Cane Corso
- Pastore Fonnese
- Lagotto
- Levriero Italiano
- Pastore Maremmano
- Segugio Italiano
- Spinone Italiano
- Volpino Italiano
- Bracco Italiano
- Cirneco dell'Etna

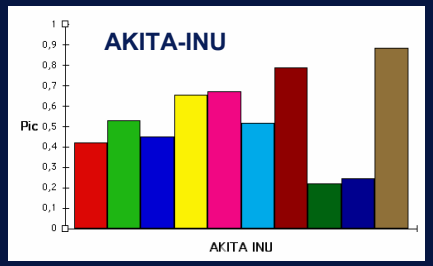
2) Razze Estere:

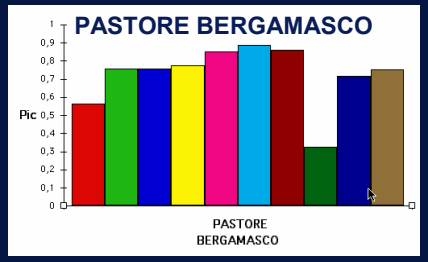
- Dobermann
- Pastore Tedesco
- Akita-Inu
- Alano
- Bassotto
- Lupo Cecoslovacco

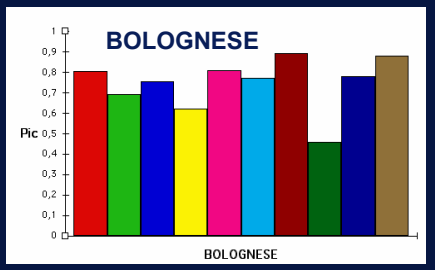
3) Altro :

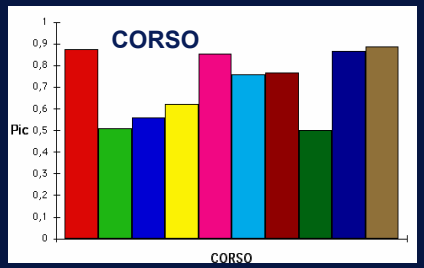
- Pastore Fonnese
- Lupo D'abruzzo
- Volpe

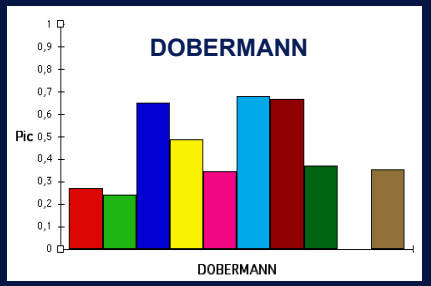
POLYMORPHISM INFORMATION CONTENT (PIC) RELATIVO AD OGNI RAZZA ED A OGNI MICROSATELLITE

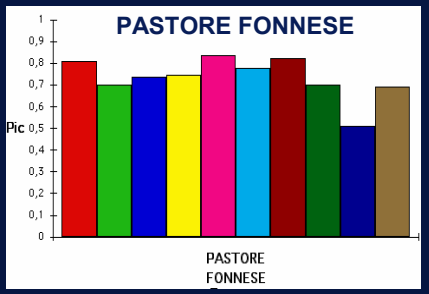


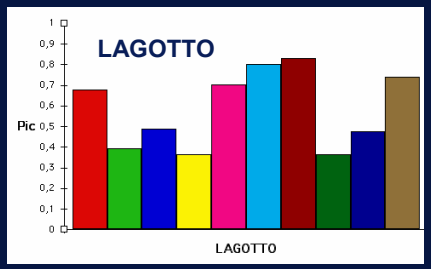


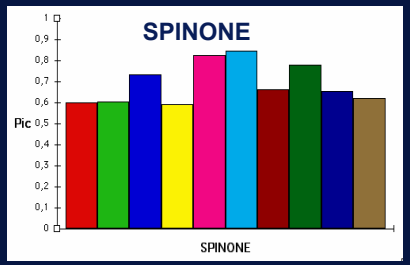


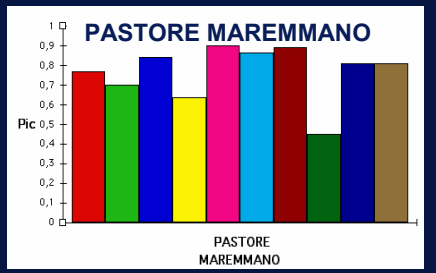


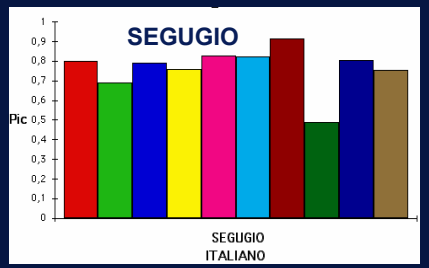


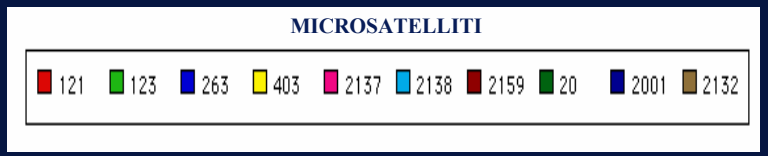


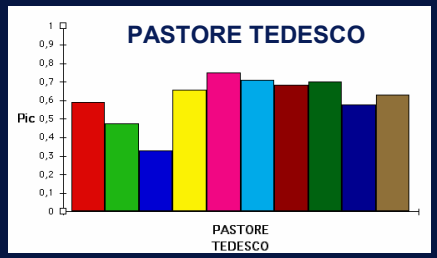






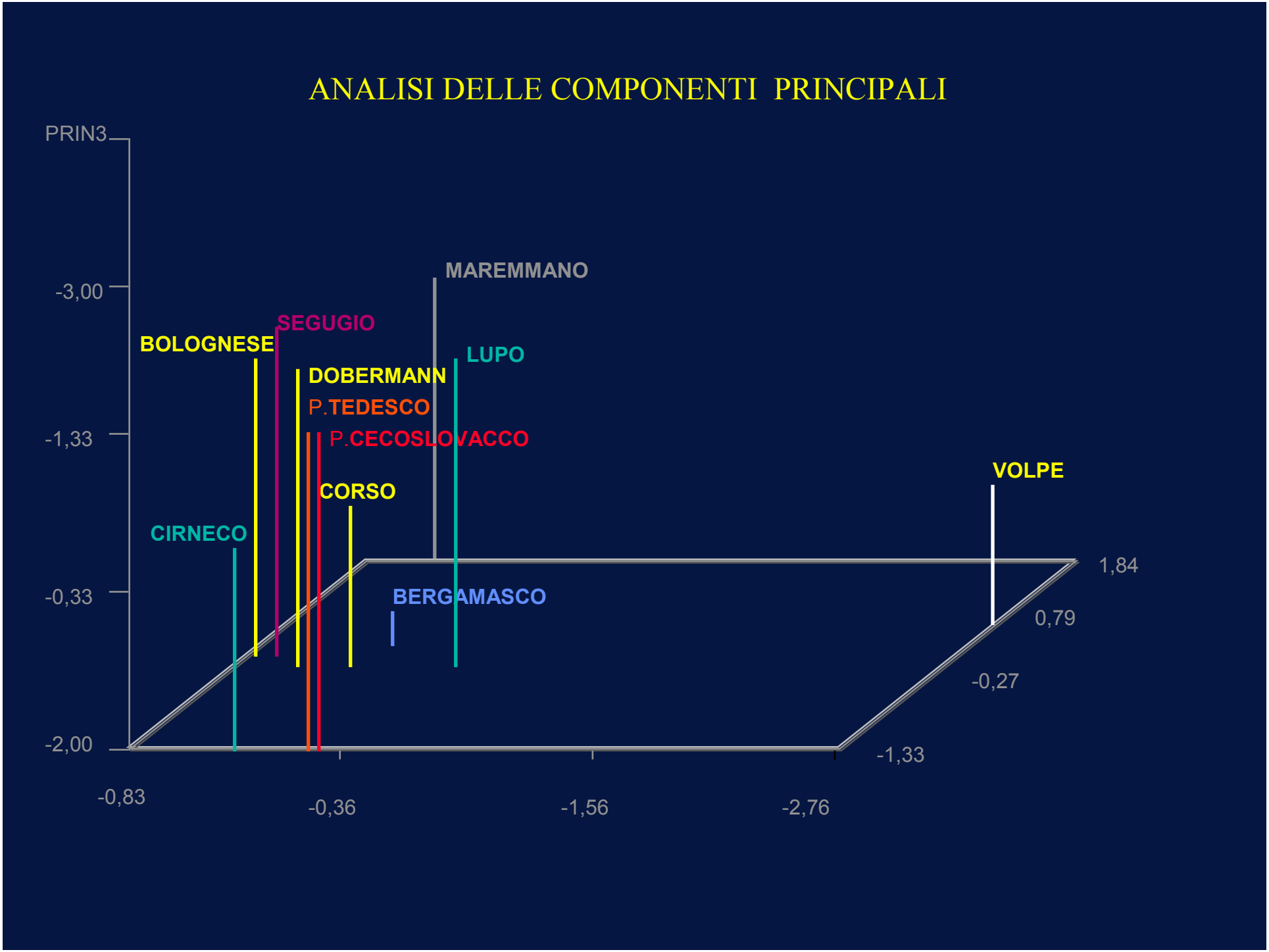






Polymorphism Information Content (PIC) e numero di alleli in alcune razze canine italiane

BREEDS	PASTORE BERGAMASCO	BOLOGNESE	BRACCO ITALIANO	CIRNECO DELL'ETNA	CORSO	PASTORE FONNESE	LAGOTTO	PASTORE MAREMMANO	SEGUGIO ITALIANO	SPINONE ITALIANO	VOLPINO ITALIANO
MICRO.	PIC %	PIC %	PIC %	PIC %	PIC %	PIC %	PIC %	PIC %	PIC %	PIC %	PIC %
ATH 121	0,552	0,833	0,691	0,794	0,882	0,853	0,718	0,791	0,805	0,519	0,828
alleles	7	8	4	6	11	10	6	8	8	4	8
CXX 123	0,738	0,726	0,664	0,637	0,769	0,763	0,56	0,725	0,722	0,628	0,721
alleles	8	5	4	5	4	7	6	7	5	5	6
CXX 263	0,846	0,77	0,794	0,802	0,537	0,739	0,51	0,858	0,845	0,756	0,788
alleles	10	7	7	8	6	9	6	9	10	7	7
CXX 403	0,806	0,662	0,729	0,738	0,614	0,767	0,373	0,648	0,812	0,597	0,749
alleles	8	6	6	5	6	8	4	5	8	4	6
CXX2137	0,649	0,76	0,448	0,753	0,8	0,751	0,809	0,849	0,743	0,826	0,788
alleles	6	9	3	6	8	8	7	11	7	7	8
CXX2138	0,789	0,65	0,717	0,503	0,504	0,864	0,761	0,848	0,805	0,846	0,825
alleles	8	9	5	3	7	10	7	9	7	9	7
CXX2159	0,796	0,861	0,495	0,678	0,775	0,801	0,853	0,884	0,854	0,596	0,765
alleles	7	9	5	4	7	9	8	12	11	5	5
CXX 20	0,371	0,552	0,109	0,637	0,5	0,621	0,442	0,748	0,515	0,628	0,652
alleles	2	4	2	6	4	5	4	7	5	7	4
CXX2001	0,709	0,728	0,616	0,701	0,847	0,487	0,64	0,805	0,733	0,637	0,743
alleles	6	7	3	4	9	5	5	9	7	5	5
CXX2132	0,806	0,863	0,779	0,691	0,881	0,761	0,767	0,87	0,822	0,441	0,87
alleles	10	13	7	6	10	7	8	9	9	5	10
pic X	0.706	0.74	0.604	0.693	0.71	0.74	0.643	0.802	0.765	0.647	0.762


ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI
PRIN3
-3,00
-1,33
-0,33
-2,00
MAREMMANO
SEGUGIO
BOLOGNESE
LUPO
DOBERMANN
P.TEDESCO
P.CECOSLOVACCO
CORSO
VOLPE
CIRNECO
BERGAMASCO
1,84
0,79
-0,27
-1,33
-0,83
-0,36
-1,56
-2,76

IDENTIFICAZIONE DEI GENI RESPONSABILI DELLE PRINCIPALI MALATTIE EREDITARIE: EREDITA' PATOLOGICA

- **MAPPAGGIO DEL GENOMA:**
  - **localizzazione di tutte le sequenze che costituiscono il genoma**
- **Obiettivo finale**
  - **Contare e localizzare tutti i geni sui cromosomi prima di determinarne la funzione**
- **Applicazione principale nel cane è quella di sviluppare dei test diagnostici per le principali malattie ereditarie o per identificare i geni responsabili per determinati fenotipi**

STRATEGIE DI STUDIO:

MALATTIE MONOGENETICHE

MALATTIE POLIGENETICHE

MAPPAGGIO DEL GENOMA NEL CANE

- MAPPE FISICHE
- MAPPE GENETICHE (linkage)
- MAPPE COMPARATIVE

TECNICHE PRINCIPALI:

PCR (Polimerase Chain Reaction)

SEQUENZIAMENTO

codice genetico:

es: *aattcgattttaggccca*

RICERCA DEL GENE CANDIDATO:

- Individuare i possibili geni candidati responsabili della malattia
  - Studi Fisiologici e biologici
  - Studi di patologie similari in altre specie
- Individuare il polimorfismo del gene candidato e controllo sul pedigree

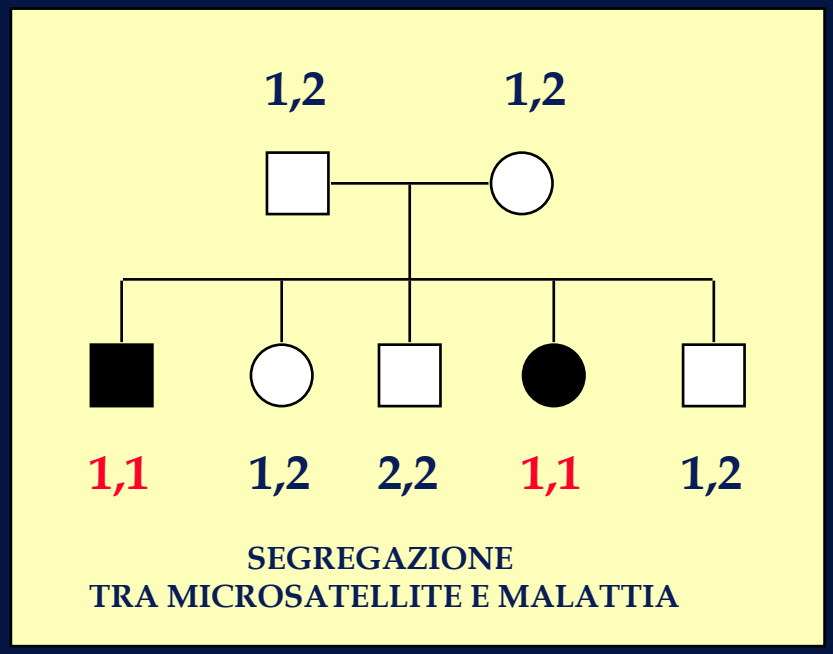
ANALISI DI LINKAGE

Identificazione di marcatori che segregano con i geni di interesse responsabili per la malattia genetica in studio

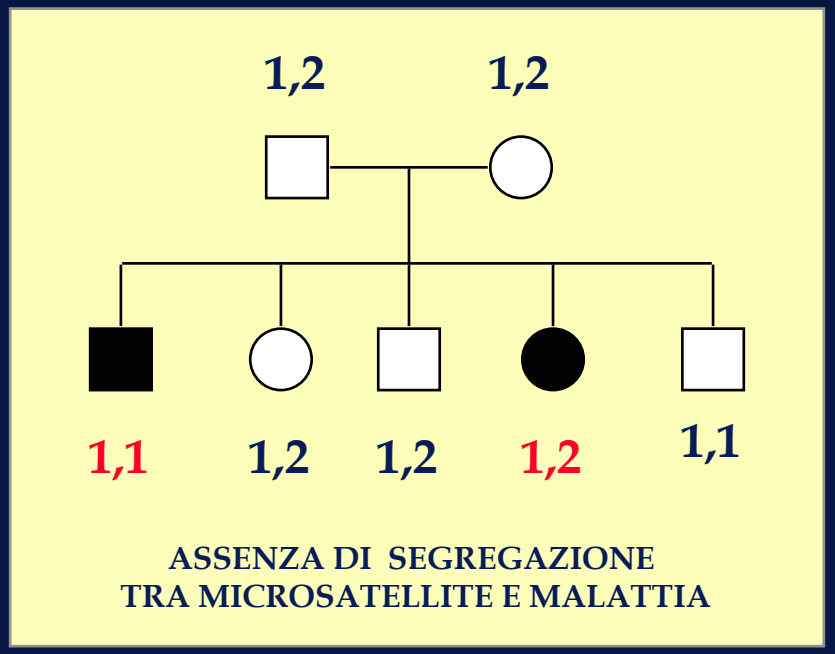
Marcatore

Geni

GENOMA

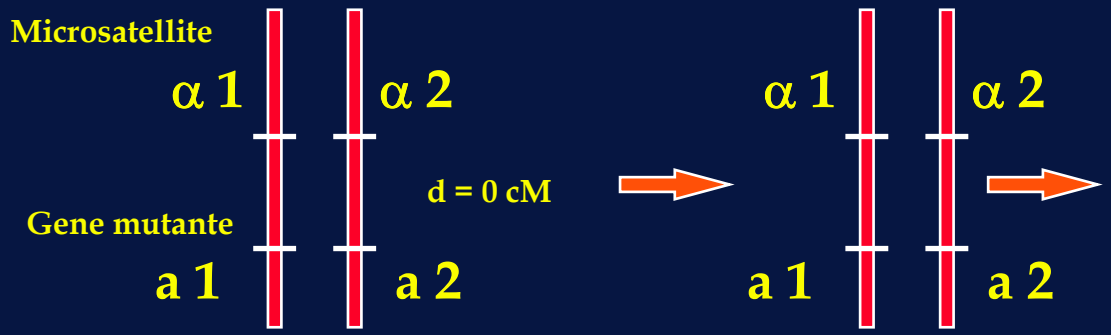


SEGREGAZIONE
TRA MICROSATELLITE E MALATTIA



ASSENZA DI SEGREGAZIONE
TRA MICROSATELLITE E MALATTIA

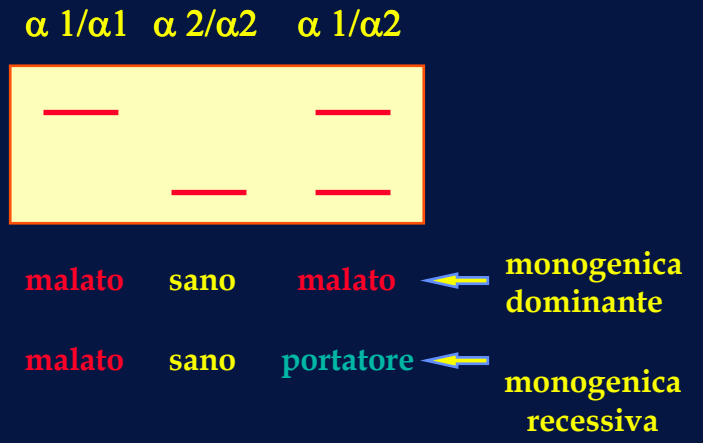
PRINCIPIO
DI UN TEST GENETICO

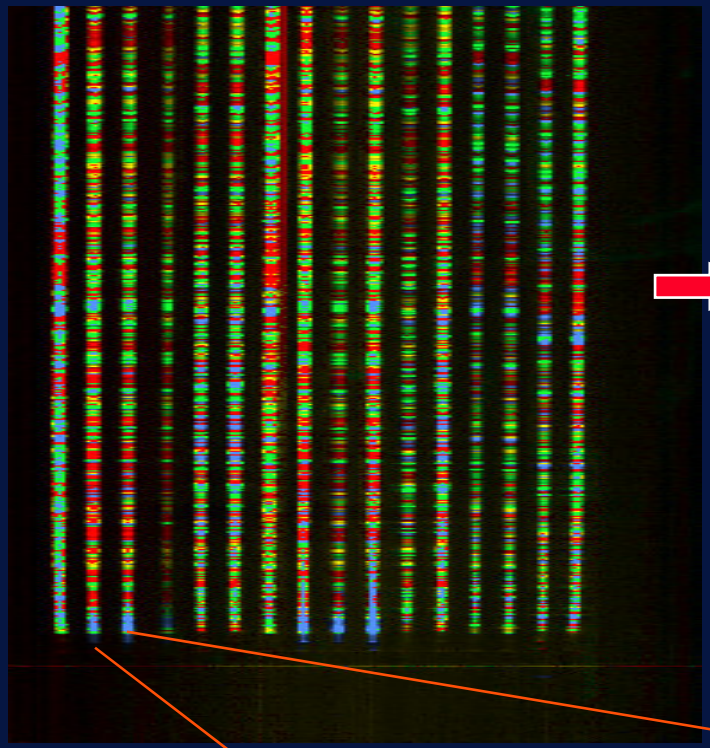


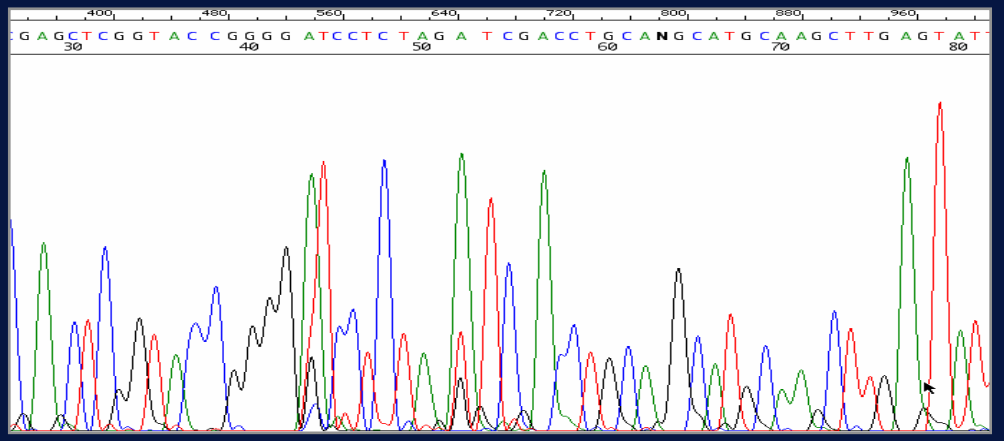
GAMETOGENESI
CROSSING-OVER MEIOTICO

GAMETI RICOMBINANTI
non c'è stata separazione tra gli alleli

Genotipi Microsatellite







SEQUENZIAMENTO

ATTGTATACNATCATATAGGCGAATCGAGCTCGGTAC
CGGGGATCCTCTAGATCGACCTGCANGCATGCAAGC
TTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGT
AATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA
TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGC
ATAAAGTGTAAAGCCTGAACTGCCTAATGAGTGAG
CTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT
TCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATG
AATCGGCCAACGCGCGGGGAAAAGCGGTTTGCGTAT
TGGGCGCTCTTCCCGCTTCCTCCGCTCACTGACTCCCT
GCGCTCGGTCCTTCCGCTTGCGGCGAACGGTATCACT
CACTCCNAAAGCGGTAATACNGTTATCCACAAAATCC
AGGGGAATAACGCCAGAAAAAACATTTTAACCAAAA
GGCCACCAAAGGCCAGAACCCTTAAAAGCcGCGTTGC
TGCTTTTTCCCCATAGCTCCCCCCCCCCGAACAACATC
CACNAAATCCACCTCCATTTCAAAGTTTGGAAN

ATTGTATACNATCATATAGGCGAATCGAGCTCGGTAC
CGGGGATCCTCTAGATCGACCTGCANGCATGCAAGC
TTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGT
AATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA
TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGC
ATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA
GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGC
TTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA
TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAAAAGCGGTTTGCGT
ATTGGGCGCTCTTCCCGCTTCCTCCGCTCACTGACTCC
CTGCGCTCGGTCCTTCCGCTTGCGGCGAACGGTATCA
CTCACTCCNAAAGCGGTAATACNGTTATCCACAAAAT
CCAGGGGAATAACGCCAGAAAAAACATTTTAACCAA
AAGGCCACCAAAGGCCAGAACCCTTAAAAGCcGCGTT
GCTGCTTTTTCCCCATAGCTCCCCCCCCCCGAACAACA
TCCACNAAATCCACCTCCATTTCAAAGTTTGGAAN

MALATTIE GENETICHE

- Esistono più di 370 malattie genetiche
- Attualmente sono disponibili circa 20 test del DNA
- Lo studio del DNA permette il riconoscimento della malattia (geni mutanti) indipendentemente dalla sua manifestazione fenotipica
- Controllo genetico della parentela

TEST DEL DNA ATTUALMENTE DISPONIBILI

- TEST BASATI SUL RICONOSCIMENTO DEL GENE MUTANTE
- TEST BASATI SUL RICONOSCIMENTO DI UN MARCATORE (Microsatellite) CORRELATO AL GENE MUTANTE
- TEST BASATI SUL RICONOSCIMENTO DEI GENI RESPONSABILI PER UNA PARTICOLARE COLORAZIONE DEL MANTELLO

TEST BASATI SUL RICONOSCIMENTO DEL GENE MUTANTE

von Willebrand's Disease	- Scottish Terrier
Phosphofructokinase Deficiency	- Springer Spaniel
Phosphofructokinase Deficiency	- Cocker Spaniel
Progressive Retinal Atrophy	- Irish Setter
Pyruvic Kinase Deficiency	- Basenji
von Willebrand's Disease	- Doberman Pinscher
von Willebrand's Disease	- Shetland Sheepdog
von Willebrand's Disease	- Manchester Terrier
von Willebrand's Disease	- Poodle (all)
von Willebrand's Disease	- Pembroke Welsh Corgi
Congenital stationary night blindness	- Briard
Globoid leukodystrophy	- W . H. White Terriers
Cystinuria	- Newfoundland

TEST BASATI SUL RICONOSCIMENTO DI UN MARCATORE (Microsatellite) CORRELATO AL GENE MUTANTE

Copper Toxicosis	- Bedlington Terriers
Progressive Retinal Atrophy	- Cocker Spaniel
Progressive Retinal Atrophy	- Labrador retriever
Progressive Retinal Atrophy	- Portuguese water dog
Progressive Retinal Atrophy	- Chesapeake Bay retriever
Renal Dysplasia	- Shih Tzu
Renal Dysplasia	- Lhasa Apso
Renal Dysplasia	- Soft Coated Terrier

TEST BASATI SUL RICONOSCIMENTO DEI GENI RESPONSABILI PER UNA PARTICOLARE COLORAZIONE DEL MANTELLO " Coat Color Tests "

Tests for presence of chocolate & yellow	-Labrador Retriever
Tests for presence of red	-Doberman Pinscher
Tests for presence of black, brown, buff/red	-American Cocker Spaniel
Tests for presence of black, liver and yellow	-Flat-coated Retriever
Tests for presence of cream, white, red and apricot	-Poodle (all varieties)
Tests for presence of - brindle and wheaten	-Scottish Terrier
Tests for presence of - brindle	-Scottish Terrier
Tests for presence of - wheaten	-Scottish Terrier

PRINCIPALI MALATTIE GENETICHE IN STUDIO

RAZZE	Early Onset (or Juvenile) Cataract	Progressive Retinal Atrophy	Canine Hip Dysplasia	Inherited Epilepsy	von Willebrand' Disease
Airedale Terrier	.	.	✓	.	.
Alaskan Malamute	.	.	✓	.	.
All not listed in description	.	.	.	.	✓
American Cocker Spaniel	✓	✓	.	.	.
Australian Shepherd	.	.	.	✓	.
Beagle	.	.	.	✓	.
Bernese Mountain Dog	.	.	✓	.	.
Boston Terriers	✓	.	.	.	.
Bullmastiff	.	.	✓	.	.
Collie	.	.	.	✓	.
Dalmatian	.	.	.	✓	.
English Springer Spaniel	.	.	.	✓	.
German Shepherd	✓	.	✓	.	.
Golden Retriever	✓	.	✓	.	.
Irish Setter	.	.	.	✓	.
Labrador Retriever	✓	✓	✓	.	.
Miniature Schnauzer	✓	.	.	.	.
Newfoundland	.	.	✓	.	.
Poodle	✓	✓	.	.	.
Portuguese Water Dog	.	✓	✓	.	.
Rottweiler	.	.	✓	.	.
Shetland Sheepdog	.	.	.	✓	.
Vizla	.	.	.	✓	.
West Highland White Terriers	✓	.	.	.	.

CONCLUSIONI

- **Il test di parentela nel cane di razza deve essere applicato in modo più efficace anche in Italia**
- **I test del DNA relativi alle malattie ereditarie, i test basati sul riconoscimento delle varianti alleliche utili per determinati fenotipi e lo studio della variabilità genetica devono diventare uno strumento di selezione per il cane di razza sempre più diffusi nella pratica veterinaria**