

Processi di domesticazione: un contributo dalle analisi del DNA mitocondriale (mtDNA) di antichi reperti scheletrici bovini (*Bos primigenius* 19.000 BP)

David Caramelli*, Serena Conti**, Andrea Martini[†], Riccardo Bozzi[‡], Cristiano Vernesi§, Brunetto Chiarelli, Paolo Boscato, Alessandro Giorgetti[¶] e Giorgio Bertorelle§.

*Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Laboratorio di Antropologia Molecolare, Università di Firenze, Firenze. §Dipartimento di Biologia, Università di Ferrara, Ferrara. ‡Dipartimento di Archeologia e Storia delle Arti, Università di Siena, Siena. ¶Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università di Firenze, Firenze.

INTRODUZIONE

L'Asia occidentale oltre ad essere uno dei più importanti centri d'origine delle prime forme di domesticazione di alcune specie vegetali, è stata anche la regione maggiormente popolata da specie animali presenti allo stato selvatico, alcune delle quali furono facilmente addomesticate dall'uomo. Tra queste quella che ha suscitato più interesse nel mondo scientifico sia per i suoi particolari caratteri morfo-etologici (lascarsa aggressività, un certo grado di adattabilità a diete diverse, il fatto di essere animali gregari sociali con una forte organizzazione gerarchica del gruppo) sia per l'importanza che essa ha rivestito nella comprensione e nella diffusione dell'agricoltura e dell'allevamento in Europa, è sicuramente il bue domestico, *Bos taurus* (Bradley, D., 1996). Recenti studi (Troy; C.S., 2001) hanno messo in evidenza come tutti i bovini domestici, tranne quelli dell'Asia sud-orientale e dell'Africa discendano da una sola specie selvatica, l'uro (*Bos primigenius*) arrivato in Europa dal Vicino Oriente con le migrazioni dei primi agricoltori neolitici. Alcuni autori (Harris, D.R. 1996) sostengono, tuttavia, che l'ampia diffusione del bue selvatico nei territori forestali dell'Europa non escluda la possibilità, come nel caso del maiale (Bokonyi, S., 1974) di una sua domesticazione indipendente in queste regioni. In questo lavoro abbiamo analizzato due sequenze di DNA mitocondriale di *Bos primigenius* rinvenute in campagne di scavo italiane e le abbiamo confrontate con 150 sequenze bovine di razze europee e 6 campioni di *Bos primigenius* al fine di capire se c'è stato e quanto è stato il contributo genetico di *Bos primigenius* "italico" nel pool genico delle moderne razze Europee.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su due frammenti di denti di *Bos primigenius* datati al C14 19600-17900 BP rinvenuti durante la campagna di scavi condotta nella Grotta Paglicci, Foggia. Dato il carattere preliminare del presente studio non tutta la sequenza del primo frammento ipervariabile della D-Loop è stata caratterizzata; sono state infatti sottoposte ad analisi filogenetiche 113 bp (16025nt-16147nt) e confrontate con 150 sequenze di bovini attuali e 6 di *Bos primigenius* (1,7,3,4) già depositate in GENEBANK.

A causa della degradazione e della scarsità di materiale di partenza, la caratterizzazione genetica di campioni antichi presenta elevate difficoltà tecniche. Per questo motivo in questo studio preliminare ci siamo attenuti per quanto possibile agli standards più stringenti per la caratterizzazione e la autenticazione del DNA antico (**golden criteria**, 6).

- Il DNA è stato estratto in un laboratorio esclusivamente dedicato all'analisi del DNA antico (**Physically isolated work area**).
- Per ogni campione sono state eseguite due estrazioni del DNA indipendenti a partire da due diversi frammenti di osso, e i controlli di PCR hanno prodotto risultati negativi (**Control Amplification**).
- Non è stato possibile amplificare lunghi frammenti di DNA, inusuali nelle analisi su reperti antichi, e la sequenza consenso finale è risultata coerente da un punto di vista filogenetico dal momento che non sembra costituita da una combinazione di sequenze differenti risultato di una contaminazione da parte di DNA esogeno (**Appropriate molecular behaviour**).
- Sono stati ottenuti gli stessi risultati in due estrazioni indipendenti e in due amplificazioni indipendenti usando tre differenti coppie di primers sovrapponibili (**Reproducibility**).
- Per ogni campione sono stati analizzati dai 10 ai 15 cloni per tratto per una media di 15-20 cloni per campione (**Cloning**).
- Per ogni campione è stato determinato il grado di racemizzazione per tre aminoacidi (acido aspartico, acido glutamico, alanina) che è risultato basso suggerendo quindi un'alta probabilità di ottenere molecole di DNA antico intatte (**Biochemical preservation**).

La parte sperimentale è stata condotta secondo le metodiche impiegate nella ref. 5, tranne per la parte relativa all'amplificazione che di seguito è descritta: due microlitri del DNA estratto sono stati amplificati con il seguente profilo termico: 94°C per 10 minuti (attivazione dell'enzima Ampli Taq Gold PE), seguita dalla ripetizione per 50 volte del seguente profilo termico: 94°C per 45 sec, 53°C per 1 min, 72°C per 1 min, con un ciclo finale di estensione a 72°C per 5 min. La miscela di reazione per un volume finale di reazione di 50 µl è stata così assemblata: 2 U di Taq polimerasi, 360 µM di ciascun dNTP, 1 µM di ciascun primer L1 6025 (5'-ACATTAATTAATGCCCCAATGC-3'), F1 6137 (5'-GCTCGTGATCTAATGGTAAGGAA-3'); come detto precedentemente abbiamo per il momento amplificato solo la prima parte delle 360 bp che costituiscono la HVR-1.

Analisi filogenetiche

Le sequenze ottenute, allineate con ClustalW (Higgins 1992) e controllate successivamente manualmente, sono state sottoposte ad analisi filogenetiche attraverso la costruzione di un albero Neighbor-joining (Phylip) (8) utilizzando una matrice di distanza genetica ottenuta con il metodo Kimura due Parametri ($\alpha=0.14$), il quale assume che esistano delle differenze nei tassi di



Fig. 1. Rappresentazione rupestre di *Bos primigenius*.

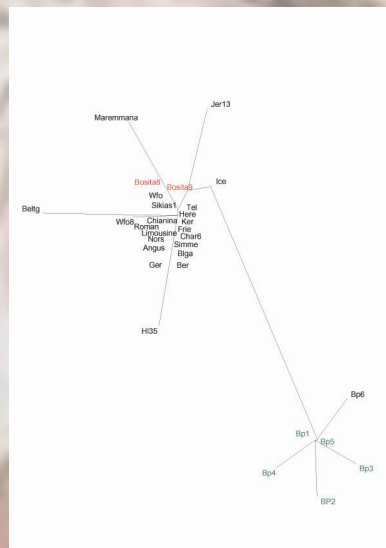


Fig. 2. Albero NJ con le principali razze europee e *Bos primigenius*: Bp1-Bp6 *Bos primigenius*, Bos9-Bos10 *Bos primigenius* "italico"; razze europee (Icelandic Kerry, Norwegian Red, Telemark, Westland Fjord); razze inglesi (Galloway, Highland Aberdeen Angus, Hereford, Jersey); razze europee continentali (German Black, Friesian, Limousin, Maremmana, Charolais, Simmental, Romagnolo, Bardena Sylva).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dal DNA analizzato secondo criteri di Cooper e Poinar, hanno fornito nell'analisi di racemizzazione Fig 3. (Asp D/L 0.053 Bos 8, Asp DL 0.068 Bos 9), indicazioni di un buon stato di conservazione. Le prime 125 bp analizzate sono uguali alla sequenza di riferimento di Anderson tranne che per la mutazione al nt 16102 per Bos 8 e al nt 16093 per il campione Bos 9. Dall'albero NJ (Fig 2) si vede come le 2 sequenze antiche prodotte in questo studio cadano all'interno della variabilità genetica delle attuali razze europee e si discostano notevolmente in termini di numero di mutazioni dai 6 campioni di *Bos primigenius* precedentemente analizzati; seppur preliminari questi risultati indicherebbero che le sequenze di DNA mitocondriale osservate nelle razze bovine europee attuali erano già presenti circa 19.000 anni fa negli antichi Auochses (*Bos Primigenius*) della penisola italiana; queste analisi potrebbero essere una prova a favore di un processo di domesticazione *in loco*.

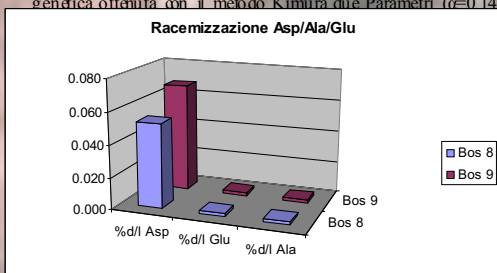


Fig. 3. Valore di racemizzazione dei 3 principali aminoacidi

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, S. et al. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *J Mol Biol* 156, 63-77 (1982).
- Bailey, J.F. et al. Ancient DNA suggests recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species. *Proc R Soc Lond B* 265, 467-473 (1998).
- Bokonyi, S. *The History of Domestic Animals in Central and Eastern Europe* (Akademiai Kiado, Budapest, 1974).
- Bradley, D.G., Madhugh, D.E., Cunningham, P. & Loftus, R.T. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5131-5135 (1996).
- Cyboron, T., Loftus, R.T., Malbon, I. & Bradley, D.G. Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle. *Proc R Soc Lond B* 266, 597-600 (1999).
- Caramelli, D., Ladinio, F., Vernesi, C., Lari, M., Casoli, A., Malgouyres, F., Chiarelli, B., Derani, L., Bernini, L., Barbieri, G., Bertorelle, G. Evidence for a genetic discontinuity between Neandertals and 24,000-year-old anatomically modern Europeans. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 27100-27104 (2006).
- Cooper, A. & Poinar, H.N. (2000). Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289, 1139.
- Eaton, H. *The Origin of the Domestic Animals of Africa* (Africa, New York, 1971).
- Felsenstein, J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package (University of Washington, Seattle, 1993).
- Harris, D.R. in *The Origins and Spread of Agriculture and Pastoralism in Eurasia* (ed. Harris, D.R.) (UCL, London, 1996).
- Loftus, R.T., Madhugh, D.E., Bradley, D.G., Shap, P.M. & Cunningham, P. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 2757-2761 (1994).
- Madhugh, D.E. et al. Early medieval cattle remains from a Scandinavian settlement in Dublin: genetic analysis and comparison with extant breeds. *Phil. Trans R Soc Lond B* 354, 99-109 (1999).
- Palma di Cesola, A. Il Palafittino Superiore in Italia: introduzione allo studio. 1993. *Galathea*, ed.
- Poinar, H.N., Hou, M., Bata, J.L. & Pailoo, S. (1996). Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272, 864-866.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. ARLEQUIN Ver. 2.0: a Software for Population Genetics Data Analysis (Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland, 1999).
- Smith, B.D. *The Emergence of Agriculture* (Scientific American Library, New York, 1995).
- Troy, C.S. Mitochondrial DNA Phylogeny and Biogeography of Domestic Cattle. Ph.D. Thesis, Univ. Dublin (1998).
- Troy, C.S., Madhugh, D.E., Bailey, J.F., Magee, D.A., Elias, R.T., Cunningham, P., Chamberlain, A.T., Sykes, B.C. & Bradley, D.G. Genetic evidence for near eastern origins of European Cattle. *Nature* 410, 1088-1091 (2001).