

Analisi di geni candidati per il locus *dilute* che determina la diluizione del colore del mantello nel coniglio

Fontanesi L.¹, Scotti E.¹, Colombo M.¹, Dall'Olio S.¹, Oulmouden A.², Russo V.¹

¹DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Università di Bologna, Italy

²UMR1061, Génétique Moléculaire Animale, INRA/Université de Limoges, France

Corresponding Author: Luca Fontanesi, DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Università di Bologna, Via F.lli Rosselli 107, 42123 Reggio Emilia, Italy - Tel. +39 0522 290516 - Fax: +39 0522 290523 - Email: luca.fontanesi@unibo.it

ABSTRACT: Investigation of candidate genes for the *dilute* coat colour locus in rabbit. Several coat colour loci remain to be characterized at the DNA level in the rabbit. Among them, the *dilute* locus is determined by a recessive coat colour mutation that dilutes the black to blue (grey) and the yellow to beige interacting with the basic colours influenced by the *Agouti* and *Extension* mutations. We selected two candidate genes for this locus (*PMEL* and *MYO5A*) and resequenced several parts of them in 8 rabbits of different coat colour (including rabbit with blue pigmentation) for a total of ~22 kb. Six single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified (2 in *PMEL* and 4 in *MYO5A*). These SNPs were not completely associated with any coat colour in the sequenced rabbit panel. Other genes should be investigated in order to characterize the *dilute* coat colour locus in rabbit.

Key words: *MYO5A*, *PMEL*, SNP, *Dilute* coat colour locus.

INTRODUZIONE – Subito dopo la riscoperta delle leggi di Mendel, il colore del mantello del coniglio è stato oggetto di studi pionieristici che hanno posto le basi genetiche di questo carattere fenotipico e hanno permesso di stabilire omologie di colorazione con altri mammiferi (Castle, 1905; Punnet, 1912; 1915; Robinson, 1958; Searle, 1968). Questi studi di genetica classica hanno evidenziato diversi loci con effetto sul colore del mantello nel coniglio: *Agouti* (*A*), *Extension* (*E*), *Albino* (*C*), *Brown* (*B*), *Dilute* (*D*), *Dutch* (*Du*), *English* (*En*), *Viennese white* (*V*) e *Silver* (*Si*) oltre ad altri, ciascuno con una propria serie allelica a volte non ben caratterizzata (Robinson, 1958; Searle, 1968; Fox, 1994). Al momento, sono stati caratterizzati dal punto di vista molecolare diversi alleli per solo tre di questi loci (*Albino*, *Agouti* e *Extension*). Il locus *Albino* codifica per il gene *Tyrosinase* (*TYR*) nel quale sono state identificate mutazioni che causano i caratteristici albinismi delle razze Bianca di Nuova Zelanda e Californiana, oltre che all'allele che determina il caratteristico colore Cincillà (Aigner et al., 2000). I loci *Extension* (*E*) e *Agouti* (*A*), che manifestano effetti epistatici, controllano la relativa proporzione dei due tipi di melanina, eumelanina e feomelanina. Il locus *Extension* codifica per *Melanocortin receptor 1* (*MC1R*) (Robbins et al., 1993) che è una proteina transmembrana della famiglia dei *G-protein-coupled receptors*, espressa nei melanociti. Mutazioni in questo gene sono state associate a differenti colori del mantello nel coniglio, tra cui il nero dominante (allele *E^D*), il rosso recessivo (allele *e*), caratteristico delle razze Fulva di Borgogna e Rossa di Nuova Zelanda, e l'allele *e^J*, caratteristico delle razze Giapponese e Pezzata tricolore (Fontanesi et al., 2006; 2007; 2010b). Il locus *Agouti* codifica per una proteina paracrina (*agouti signaling protein*,

ASIP) (Bultman *et al.*, 1992) che agisce come antagonista dell'ormone MSH legandosi a MC1R, inibendone l'interazione e quindi la sua attivazione con conseguente produzione di feomelanine. Una mutazione nell'esone 2 del gene *ASIP* determina l'allele *a* non-agouti che produce una colorazione nera recessiva (Fontanesi *et al.*, 2010a).

Il locus *dilute* è caratterizzato da un allele recessivo che diluisce il nero a blu (o grigio) e il giallo/rosso a beige, interagendo con le colorazioni di base determinate dai loci *Extension* e *Agouti* (Robinson, 1958; Searle, 1968; Fox, 1994). In altre specie, in particolare nel topo e nel bovino, simili effetti fenotipici sono causati da mutazioni in alcuni geni tra cui i geni *premelanosome protein (PMEL)* – conosciuto anche con il nome di *melanocyte protein Pmel 17 (PMEL17)* o *silver (SILV)* – e *myosin VA (MYO5A)* (Mercer *et al.*, 1991; Martinez-Esparza *et al.*, 1999; Oulmouden *et al.*, 2005). Questi geni codificano per proteine che svolgono un ruolo come componenti dei melanosomi o nel trasporto di questi organelli cellulari, e quindi coinvolte nei meccanismi di determinazione della pigmentazione. Dal punto di vista applicativo, ad esempio, nella specie bovina una mutazione del gene *PMEL* è utilizzata per la tracciabilità della carne di razza Charolais (Oulmouden *et al.*, 2005). Mutazioni in altri geni che determinano il colore del mantello sono utilizzate per la tracciabilità di prodotti monorazza in diverse specie di interesse zootecnico (Fontanesi, 2009).

Con l'obiettivo di individuare il gene che determina il locus *dilute*, qui riportiamo l'identificazione di polimorfismi del DNA (SNP) nei geni *PMEL* e *MYO5A*, che possono essere utilizzati in studi di associazione con il fenotipo oggetto di studio.

MATERIALI E METODI – Otto conigli di diverse razze e linee famigliari con diverso colore del mantello (incluso il colore blu) sono stati utilizzati per il sequenziamento di diverse parti dei geni *PMEL* e *MYO5A* nel coniglio. Il DNA è stato isolato da sangue e/o da bulbi piliferi utilizzando protocolli standard o seguendo le indicazioni riportate da Fontanesi *et al.* (2006; 2007). Quattro coppie di primers sono state disegnate per ciascun gene sulle sequenze disponibili in Ensembl. Tutte le coppie amplificano regioni esoniche e regioni introniche contigue. Le amplificazioni sono state effettuate in un volume di 20 µl contenenti 1 U di EuroTaq DNA polimerasi (EuroClone Ltd.), 1X PCR Buffer, 2,5 mM dNTPs, 10 pmol di ciascun primer e 1,0 mM di MgCl₂. Il profilo PCR utilizzato, su un termociclatore PTC-100 (MJ Research), è stato il seguente: 5 minuti a 95 °C; 35 cicli di amplificazione di 30 secondi a 95 °C, 30 secondi a 57-62 °C, 30 secondi a 72 °C; 10 minuti a 72°C. I prodotti PCR sono stati utilizzati, dopo trattamento con ExoSAP-IT® (USB Corporation), per la reazione di sequenziamento effettuata utilizzando il kit Big Dye v3.1 (Applied Biosystems). Le reazioni di sequenziamento, dopo alcuni passaggi di purificazione, sono state caricate su un sequenziatore a capillare (ABI3100 Avant sequencer, Applied Biosystem). Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando il software CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation).

RISULTATI E CONCLUSIONI – L'attività di risequenziamento del gene *PMEL* ha prodotto, in totale, 10456 bp di sequenze. Dalla loro analisi sono stati identificati solo 2 SNP, entrambi localizzati in regioni introniche (g.39510357G>A; g.39508302G>A). Nel pannello usato per il sequenziamento, i due SNP risultano in *linkage disequilibrium*. Dai dati di sequenziamento non sembra che conigli con diverso colore del mantello riportino alleli alternativi negli SNP identificati.

Il risequenziamento del gene *MYO5A* ha prodotto, in totale, 11192 basi di sequenze. Diversi SNPs sono stati identificati in regioni introniche (g.20112264C>T; g.20122143C>T) o in regioni esoniche codificanti (g.20122039G>A, g.20121949G>A), anche se queste ultime sono varianti sinonime, cioè che non cambiano aminoacido. Anche per i polimorfismi in questo gene, non sembra vi sia una associazione tra gli SNP identificati e la presenza/assenza di colorazione blu del mantello. Da questa prima analisi emerge che i polimorfismi identificati nei geni *PMEL* e *MYO5A* non sono associati con il colore blu del mantello (diluito). Tuttavia la genotipizzazione di alcuni di questi SNP in famiglie in cui segrega anche il colore blu del mantello potrà essere utile per confermare questo risultato. Altri geni candidati dovranno essere studiati per evidenziare marcatori associati con la diluizione del colore del mantello nel coniglio.

BIBLIOGRAFIA – **Aigner**, B., Besenfelder, U., Müller, M., Brem, G., 2000. Tyrosinase gene variants in different rabbit strains. *Mamm. Genome* 11:700-702. **Bultman**, S.J., Michaud, E.J., Woychik, R.P., 1992. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71:1195-1204. **Castle**, W.E., 1905. Heredity of coat characters in guinea pigs and rabbits. *Carnegie Inst. Washington Publ.* 23, pp. 1-78. **Fontanesi**, L., 2009. Genetic authentication and traceability of food products of animal origin: new developments and perspectives. *Ital. J. Anim. Sci.* 8(Suppl. 2):9-18. **Fontanesi**, L., Tazzoli, M., Beretti, F., Russo, V., 2006. Mutations in the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Anim. Genet.* 37:489-493. **Fontanesi**, L., Tazzoli, M., Russo, V., 2007. Non-invasive and simple methods for sampling rabbit DNA for PCR analysis of melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene mutations: a technical note. *World Rabbit Sci.* 15:121-126. **Fontanesi**, L., Forestier, L., Allain, D., *et al.*, 2010a. Characterization of the rabbit agouti signaling protein (*ASIP*) gene: transcripts and phylogenetic analyses and identification of the causative mutation of the nonagouti black coat colour. *Genomics* 95:166-175. **Fontanesi**, L., Scotti, E., Colombo, M., *et al.*, 2010b. A composite six bp in-frame deletion in the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene is associated with the Japanese brindling coat colour in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *BMC Genet.* 11:59. **Fox**, R.R., 1994. Taxonomy and Genetics. In: P.J. Manning, D.H. Ringler, C.E. Newcomer (eds), *The Biology of the laboratory rabbit*. 2nd edition, Academic Press, San Diego, CA, pp. 1-26. **Martinez-Esparza**, M., Jimenez-Cervantes, C., Bennett, D.C., *et al.*, 1999. The mouse *silver* locus encodes a single transcript truncated by the *silver* mutation. *Mamm. Genome* 10:1168-1171. **Mercer**, J.A., Seperack, P.K., Strobel, M.C., *et al.*, 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature* 349:709-713. **Oulmouden**, A., Julien, R., Laforet, J.-M., Leveziel, H., 2005. Use of silver gene for authentication of the racial origin of animal populations, and of the derivative products thereof. Patent Publication WO2005/019473. **Punnett**, R.C., 1912. Inheritance of coat colour in rabbits. *J. Genet.* 2:221-238. **Punnett**, R.C., 1915. Further experiments on the inheritance of coat colour in rabbits. *J. Genet.* 5:38-50. **Robbins**, L.S., Nadeau, J.H., Johnson, K.R., Kelly, M.A., Roselli-Reh fuss, L., Baack, E., Mountjoy, K.G., Cone, R.D., 1993. Pigmentation phenotypes of variant Extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72:827-834. **Robinson**, R., 1958. Genetic studies of the rabbit. *Bibliogr. Genet.* 17:229-558. **Searle**, A.G., 1968. Comparative genetics of coat colour in mammals. Logos Press, London, UK.