

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN “SCIENZE ZOOTECNICHE
XXI CICLO

settore scientifico disciplinare
“AGR17”

**"DIFFERENZIAMENTO GENETICO E DINAMICHE DI POPOLAZIONE NEL
MERINO EUROPEO"**

VINCENZO LANDI

RELATORE:

Prof. ssa Francesca Maria Sarti

CO RELATORE:

Dr.ssa Amparo Maria Martinez Martinez

COORDINATORE:

Prof. Luciano Morbidini

A. A. 2007/08

Soldato persiano: "Arrenditi o i nostri dardi oscureranno il sole!!"

Leonida: "Ah! Allora combatteremo nell'ombra!"

Erodoto

Non sopporto chi non sa prendere sul serio il cibo!

Oscar Wilde

"La libertà, Sancho, è uno dei doni più preziosi che i cieli abbiano concesso agli uomini. i tesori tutti che si trovano in terra o che stanno ricoperti dal mare non le si possono eguagliare. e per la libertà, come per l'onore, si può avventurare la vita".

Don Quijote

A Vincenzo

A Mamma e Papà che della mia vita hanno fatto

Il loro unico obiettivo dell'esistenza.

A Laura che sei la mia forza interiore, il coraggio ed ... intelligenza emotiva!

Sommario

RIASSUNTO	1
PREMESSA	3
RINGRAZIAMENTI	4
INTRODUZIONE	1
FILOGENESI DELL'OVINO DOMESTICO	1
LA RAZZA MERINO	2
❖ Storia e origine	2
❖ Caratteristiche di razza.....	4
❖ La produzione di carne	6
❖ La produzione di lana	6
LE PRINCIPALI RAZZE EUROPEE.	7
❖ La Merino Portoghese	7
❖ Le Merinizzate italiane	8
❖ La Polski Merino.....	13
❖ La Merino Francese	14
❖ La Merinos Tedesca	18
LE MERINOS - IMMAGINI:.....	20
L'IMPORTANZA DELLO STUDIO DELLA DIVERSITÀ ANIMALE	31
❖ La caratterizzazione genetica tra genetica e scienza sociale.	31
❖ La caratterizzazione e il concetto di razza	33
GLI STRUMENTI PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA	36
❖ Dai marcatori fenotipici ai molecolari	36
❖ Tipi di Marcatori molecolari basati sul DNA.....	39
MARCATORI MICROSATELLITI	47
❖ Generalità	47
❖ Meccanismo di evoluzione e di Mutazione	50
❖ La tecnica di studio dei microsatelliti.	53
ERRORI DI TIPIZZAZIONE.	63
❖ Tipi e cause degli errori di determinazione del genotipo.	64
STATISTICA E GENOMICA.	70

❖ Genoma e popolazione	70
❖ Il disegno sperimentale	71
❖ Metodi d'inferenza classici	78
❖ Metodi d'inferenza probabilistici	83
IL DNA MITOCONDRIALE	85
❖ Teoria evolutiva dei mitocondri	85
❖ Il genoma mitocondriale	85
❖ Il genoma mitocondriale ovino	91
❖ Dna Mitocondriale e Filogenesi	93
❖ Lo studio del DNA mitocondriale nella pecora domestica	95
SCOPO DELLA TESI	105
MATERIALI E METODI.....	106
STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ TRAMITE MARCATORI MICROSATELLITI.	106
❖ Campionamento	106
❖ Estrazione e conservazione del DNA.....	107
❖ Disegno del panel di microsatelliti.....	108
❖ Amplificazione delle sequenze ed Elettroforesi	111
❖ Analisi statistica dei dati.	113
STUDIO DEL DNA MITOCONDRIALE.....	116
❖ Disegno dei primer	116
❖ Studio della sequenza.....	118
❖ Le razze studiate	120
❖ Analisi Statistica	121
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	124
MARCATORI MICROSATELLITI.....	124
❖ Diversità genetica	124
❖ Studio della differenziazione genetica	134
DIVERSITÀ E STUDIO FILOGENETICO CON IL DNA MITOCONDRIALE.....	152
❖ Diversità aploipica.....	152
❖ differenziazione genetica	153
CONCLUSIONI	163
BIBLIOGRAFIA	164

Indice delle tabelle

Tabella 1: principali caratteristiche della produzione di lana del Merino Spagnolo	6
Tabella 2: possibilità d'uso di alcune principali distanze genetiche in base al modello e alle dimensioni della divergenza (Eding & Laval 1998).	80
Tabella 3: Alcune caratteristiche del DNA mitocondriale a confronto con quello nucleare.	89
Tabella 4: razze utilizzate nello studio e rispettiva origine geografica, numero d'individui e abbreviazione.* Il M. Precoce (razza francese) e il M. Fleischaf (razza tedesca) sono oggi allevati in gran numero in Spagna mentre sono diventate rare nei paesi di origine.	106
Tabella 5: Alcune caratteristiche dei marcatori utilizzati e relativo riferimento bibliografico. 1, Moore et al. (1997); Buchanan et al. (Buchanan <i>et al.</i> 1991); 3, Bishop et al. (Bishop <i>et al.</i> 1994); 4, Moore & Byrne (Moore & Byrne 1993); 5, Davies et al. (Davies <i>et al.</i> 1996); 6, Vaiman et al. (Vaiman <i>et al.</i> 1994); 7, Steffen et al. (Steffen <i>et al.</i> 1993); 8 e 9 Buchanan & Crawford (1992; 1993); 10, Ihara et al. (Ihara <i>et al.</i> 2004); 11, Blattman et al. (Blattman & Beh 1992); 12, Hulme et al. (Hulme <i>et al.</i> 1994); 13, (Brezinsky <i>et al.</i> 1993); 14, Geroger & Massey (Georges & Massey 1992); 15, De Gortari et al. (De Gortari <i>et al.</i> 1997); 16, Solinas Toldo et al. (Solinas Toldo <i>et al.</i> 1993); 17, Kossarek et al. (Kossarek <i>et al.</i> 1993); 18, Ede et al. (Ede <i>et al.</i> 1995); 19, Penty et al. (Penty <i>et al.</i> 1993); 20, Pierson et al. (Pierson <i>et al.</i> 1993); 21, Broom et al. (Broom <i>et al.</i> 1996).	109
Tabella 6: Caratterististe delle reazioni multiplex e dell'elettroforesi.....	110
Tabella 7: Miscela base della reazione di PCR	111
Tabella 8: campioni utilizzati nella procedura di standardizzazione.	113
Tabella 9: caratteristiche delle sequenze utilizzate per il disegno dei primer.	117
Tabella 10: primer utilizzati per lo studio del DNA mitocondriale.	118
Tabella 11: miscela della reazione di sequenziamento	119
Tabella 12: livelli gerarchici nel calcolo dell'Amova.....	123
Tabella 13: numerosità del campione, loci tipizzati, eterozigosità attesa (He) e osservata (Ho), numero medio di alleli e coefficiente Fis ($p < 0,05$) calcolato con 1000 bootstraps.	124
Tabella 14: parametri di diversità genetica per ogni locus nel campione totale.....	125
Tabella 15: significatività del disequilibrio di Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) secondo il metodo delle catene di Markov. Le "N" indicano i marcatori per quale non è stato possibile calcolare il dato per la presenza di missing data o basso polimorfismo del marcatore.	131
Tabella 16 a: valori di eterozigosità attesa per razza e per marcatore (primi 19 marcatori).	132
Tabella 17: valori delle distanze genetiche tra le razze in studio (metodo Reynolds J., unweighted 1983, nel quadrante superiore e con il metodo Nei et al., Da di Nei et al. 1983 in quello inferiore).	136
Tabella 18: coefficiente di appartenenza a ciascun cluster dopo 500.000 iterazioni con 15 k assunti.	144
Tabella 19: probabilità di non esclusione per un parente candidato, per una parente dato il genotipo dell'altro parente, di entrambi i genitori, di identità tra individui non relazionati e tra fratelli e frequenza teorica degli alleli nulli.	148
Tabella 20: rank dei marcatori in base al polimorfismo e in base alla probabilità di esclusione, frequenza degli alleli nulli e alleli privati.	149
Tabella 21: Diversi parametri di polimorfismo della sequenza nelle razze merino considerate nello studio del DNA mitocondriale.	152
Tabella 22: Analisi della varianza molecolare (AMOVA) secondo differenti gerarchie.....	161

Indice delle figure

Figura 1: ariete di 3 anni di razza Merino Spagnola (EAAP©).	20
Figura 2: agnella di un anno di razza Merino Spagnola (Emanuela Tullo e Laura Rigazio ©).	20
Figura 3: ariete di razza Merinos Rambouillet (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©). 20	
Figura 4: pecora adulta di razza Merinos Rambouillet (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).	20
Figura 5: pecora adulta e agnello di razza Merinos D'Arles (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).	21
Figura 6: pecora adulta di razza Merinos D'Arles (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).	21
Figura 7: ariete di razza Merinos D'Arles (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).	21
Figura 8: pecore di razza Merinos Est-a-Laine al pascolo sulle Alpi francesi (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).	22
Figura 9: pecora adulta di razza Merinos Est-a-Laine (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).	22
Figura 10: ariete di razza Merinos Est-a-Laine (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©). .	22
Figura 11: pecore di razza Merino da Beira	23
Figura 12: ariete di razza Merino da Beira Baixa (http://docentes.esa.ipcb.pt ©).	23
Figura 13: pecora di razza Merino Petro	23
Figura 14: pecore di razza Merino Branco	23
Figura 15: gregge di pecore di razza Merino Polish (Zofia and Mirosław Raczkowski – Poland ©).	24
Figura 16: gruppo di giovani arieti di razza Merino Polish (Zofia and Mirosław Raczkowski – Poland ©).	24
Figura 17: ariete di razza Sopravissana (Prof. Mariano Pauselli ©)	25
Figura 18: gregge di ovini di razza Sopravissana durante la transumanza	25
Figura 19: agnello di 40 giorni di razza Sopravissana.	26
Figura 20: pecore e agnelle di razza Sopravissana (Vincenzo Landi ©).	26
Figura 21: pecora di razza Gentile di Puglia (Lane d'Italia ©).	27
Figura 22 ariete di razza Gentile di Puglia (Assonapa ©).	27
Figura 23: arieti di razza Merinos Precoce	27
Figura 24: ariete di razza Merinizzata Italiana Gentile (Assonapa ©).	27
Figura 25: ariete di razza Merinos Fleischaf (Università di Córdoba – Produccion Animal).	28
Figura 26: documento di notifica degli affari dello Stato della Chiesa che attesta l'allevamento della Merino nel Centro Italia.	29
Figura 27: diagramma temporale dell'espansione del Merino in Europa, le linee tratteggiate (---) indicano movimenti di animali sporadici e non ufficiali (Vincenzo Landi ©).	30
Figura 28: meccanismo di evoluzione della sequenza del microsatellite (modificato con il permesso di Ellegren, 2004©).	50
Figura 29: l'insieme dei fenomeni che influenzano la forma finale dei picchi in un individuo eterozigote (A e B.	69
Figura 30: tendenza del valore di probabilità di riscontrare tutti gli alleli di una popolazione per differenti valori di polimorfismo (K=numero di alleli) e differente dimensione del campione. La linea orizzontale	

indica il valore di probabilità del 99%. Modificato con il permesso dell'autore, (B-Rao 2001) e dell'editore (© 2008 S. Karger AG, Basel).....	73
Figura 31: diagramma di risposta spaziale del valore del coefficiente F_{st} al variare dell'errore, numero di individui e loci utilizzati (con il permesso dell'autore, Quiroz 2007).....	74
Figura 32: picchi elettroforetici dello standard di peso molecolare Genescan rox 400HD.	112
Figura 33: parte delle sequenze del gene tRNA-Pro allineate in diversi soggetti della famiglia dei Bovidi	116
Figura 34: schema del sito di inserzione dei primer utilizzati per lo studio della sequenza.....	117
Figura 35: dendrogramma costruito su 1000 bootstraps con metodo Neighbor- Joining a partire della distanza DA (Nei 1972).....	139
Figura 36: dendrogramma costruito su 1000 bootstraps con metodo UPGMA a partire della distanza DA (Nei 1972).....	140
Figura 37: dendrogramma costruito su 1000 bootstraps con metodo Neighbor - Joining a partire della distanza di Reynolds (Reynolds et al. 1983).....	141
Figura 38: grafico del valore medio del log k su 5 run indipendenti del software Structure.....	144
Figura 39: percentuale di assegnazione degli individui delle razze studiate ai 15 cluster assumendo $K=2 \rightarrow 15$	145
Figura 40: percentuale di assegnazione con 15 K assunti con tutti i 33 marcatori in equilibrio (I), con 10 marcatori con valori più alti di H_e (II), 10 marcatori con più alto valore di PA (III), 10 marcatori selezionati in base a tutti i parametri della tabella 20 (IV) e 15 marcatori selezionati in base a tutti i parametri della tabella 20 (V).	151
Figura 41: Neighbor-Joining calcolato con il metodo p-distance.....	158
Figura 42: albero a rete calcolato secondo il metodo minimum spanning network.	159
Figura 43: albero a rete calcolato secondo il metodo Median_Joining.....	160

Secondo le statistiche ufficiali, delle circa 6300 varietà o razze appartenenti alle diverse specie di mammiferi ed uccelli già 740 sono ufficialmente estinte mentre altre 1400 (il 32% circa) sono ad elevato rischio. La salvaguardia della biodiversità animale, caratteristica importante, nelle produzioni animali come mezzo di sopravvivenza ed evoluzione per il futuro, è uno degli obiettivi a livello internazionale. Inoltre capire la variabilità del genoma che interagisce con le influenze esterne, può portare a preziose informazioni sui geni che influenzano i caratteri di interesse zootecnico.

La razza Merino e le sue derivate rappresentano il tipo genetico più allevato al mondo. Questa razza era sicuramente allevata già in epoca romana nella penisola iberica per l'eccezionale qualità della lana tanto che si curava attentamente la selezione per questo carattere, come scrive lo storico Columella.

In questo lavoro si sono studiate 15 razze di origine Merino tra le principali allevate in alcuni paesi europei: Sopravissana, Gentile di Puglia e Merinizzata Italiana (Italia); Merino Spagnolo, Fleischaf e Precoce (Spagna); Merino Branco, Beira Baixa e Preto (Portogallo); Merino Rambouillet, D'Arles e Est-a-laine (Francia) e Merino Polsky (Polonia). La caratterizzazione a livello molecolare è stata condotta attraverso 38 loci microsatelliti; inoltre, si è studiata la sequenza del DNA mitocondriale per condurre un'indagine filogenetica.

I risultati fanno concludere che nelle razze merino europee esiste un alto livello di introgressione e la struttura genetica di popolazione non risulta chiara e definita a causa delle numerose migrazioni di animali durante i secoli, cosa riscontrabile anche a livello del DNA mitocondriale il quale conserva una variabilità molto alta a livello individuale e non a livello razziale.

La variabilità effettivamente presente è essenzialmente derivata geneticamente e all'isolamento geografico. Tuttavia un corretto disegno di un adeguato panel di microsatelliti permetterebbe l'applicazione di un protocollo di tracciabilità e assegnazione razziale.

ABSTRACT

According to the official statistics, about 740 from 6300 varieties or breeds belonging to different species of mammals and birds, are officially disappeared and 1400 (approximately 32%) are at high risk of extinction; besides of that was set a panel of international rules for the preservation of animal biodiversity. The aim of these rules was the breeds survival for the needs of the generations future and the conservation of the variability that get the genome able to interact with external factors.

The Merino and its derived breeds represent the genetic type most reared in the world. This breed was already reared in Roman times in the Iberian peninsula because of the great quality of its wool and therefore was mainly selected for this character, as the historian Columella reports.

In this work 15 derived Merino breeds kept in several European countries were studied: Sopravissana, Gentile di Puglia and Merinizzata Italiana (Italy); Spanish Merino, and Fleischschaf Early (Spain); Merino Branco and Preto Beira Baixa (Portugal); Merino Rambouillet, D'Arles and East-a-laine (France) and Merino Polski (Poland). Thirty eight microsatellites loci were used for a molecular characterization and the sequence of mitochondrial DNA (d-loop) was investigated.

The results obtained in the microsatellites analysis show that in European merino breeds exist a high level of introgression, moreover the population genetic structure is not clear and well defined because of the many selection program and because of several merino flocks migration over the centuries; because of that the mitochondrial DNA only show a very high variability at the individual level of and not at the breed level.

These actual variability in this breed is mainly derived from genetic drift and geographic isolation. However, the use of a suitable panel of microsatellites could allow the implementation of a protocol for product traceability and for the individual assignment.

Questo progetto di caratterizzazione genetica e di studio della biodiversità di un importantissimo gruppo di razze ovine europee non ha ricevuto finanziamenti da nessun ente o istituzione. Ringrazio, quindi, quanti non mi hanno dato la ragione di ringraziarli.

Tutto ciò che si è realizzato lo si deve alla caparbia delle persone che hanno lavorato e collaborato alla sua stesura, ben consci dell'importanza potenziale che la specie ovina rappresenta per la nostra agricoltura.

I numerosi allarmi sanitari che hanno coinvolto il settore bovino prima e quello avicolo poi e che sembrano interessare, in questi giorni, anche l'allevamento suino, non hanno avuto il dovuto effetto preventivo sulle nostre istituzioni che si limitano a mettere "la toppa" quando il disastro è già avvenuto; è così che il settore ovino è abbandonato a se stesso e al coraggio dei nostri allevatori, che oltre a preservare un'antica ma attualissima pratica di allevamento, contribuiscono al mantenimento dei nostri ambienti marginali altrimenti abbandonati.

Oggi il nostro Paese importa più del 40% del fabbisogno in carne ovina dall'estero e la nostra industria laniera, tra le più rinomate del mondo, compra fibra animale proveniente da un altro emisfero.

Manca totalmente la volontà di creare una filiera nazionale in grado di risollevarlo il settore e, troppe volte, allevatori, tecnici e quanti altri vi lavorano non ricevono i dovuti mezzi per operare i giusti interventi.

Speriamo soprattutto in Italia, che la crisi economica porti alla rivale l'importanza di avere un settore primario forte insieme alla convinzione che non bastano (o meglio non servono!) aiuti di sussistenza ma piuttosto seri piani di investimento nelle infrastrutture, nella ricerca e nell'organizzazione della filiera commerciale.

RINGRAZIAMENTI

Una tesi di dottorato è sempre un lavoro di squadra che coinvolge più persone, e forse al di là del significato scientifico e formativo per lo studente di dottorato, il suo vero scopo è quello di insegnare la cooperazione e la condivisione della ricerca.

Innanzitutto un doveroso ringraziamento va ai tesisti che, in questi tre anni, hanno prestato il loro impegno, passione e dedizione alle varie attività del gruppo di ricerca. Più in particolare ringrazio gli studenti che insieme a me hanno partecipato a questo lavoro, tra i quali Matteo Bianchi. Il primo incontro con Matteo è stato normale, infatti, dopo una giornata di laboratorio sembrava uno dei tanti tesisti che lavorava con interesse a quello che si faceva...già un mese dopo si era trasformato in uno stakanovista che neanche il fuoco riusciva a scacciare dal laboratorio; e, sicuramente, devo anche al suo prezioso aiuto e competenza l'ottenimento dei dati di questo lavoro!

Ancora devo ringraziare Emanuela, con la quale condivido oggi una splendida amicizia, per l'ormai biennale sostegno nella parte di studio del DNA mitocondriale e per la sua caparbia con il Pc, anche quando io, che mi consideravo caparbio con gli strumenti informatici, ero sull'orlo di una crisi isterica.

Ma il successo lavorativo dipende in gran parte dalla felicità nella vita, e se oggi vivo una vita appagata lo devo ai miei cari amici, ormai insieme a me reduci di una vita da studenti che fu. Iniziamo le premiazioni con Massimo (detto cavallo pazzo...tutto un programma!) per la sua simpatia ai limiti dell'eccesso e per il buon umore che è sempre riuscito ad infondermi, a lui va il giullare d'oro. Ad Anna Lia (o Nasca per gli intimi) va il premio nostalgia canaglia, per i continui rimpianti della vita da matricola che nessuno di noi in realtà riuscirebbe più a reggere oltre le 21.45 di sera, bei tempi! Grazie Anna Lia! A Veronica va il premio Leopardi 2008, per il continuo dissidio interiore e la perenne insicurezza nelle scelte, che sempre, si tramuta nelle classiche gaf e vicissitudini della nostra castellana che spesso riescono a metterti il buon

umore. A Gianni va il pelato di Manciuaria d'argento: di Gianni potrei dire tante, molte...troppe cose: l'episodio che più ricordo della sua amicizia sono i pomeriggi passati a studiare economia tra una busta di taralli e una salsiccia secca; grazie soprattutto per essere sempre un amico presente, sincero (anche troppo) e fedelissimo!

Un ringraziamento particolare va ai miei colleghi della sezione di Scienze Zootecniche per i bei momenti passati...a magnà!!! Quanti ristoranti, cene e cenette e come dimenticare il caro appuntamento di Natale in biblioteca? E le patatine fritte al Bratislava con Emiliano? E le tagliate alla "Bistecca? Grazie a tutti! Grazie Leonardo per le logorroiche chiacchierate e grazie "Cestola" per gli scorci di dialetto perugino davvero originali! Grazie Raffa per la tua simpatia, soprattutto quando si sente una donna finita. Un grazie anche a Braccino e a Martina per i loro match degni di Zelig Circus! Grazie a Michele e Caterina (detti chip e chop) al "pollo d'erba" e a Francesca! Un grazie vivissimo va ad Emiliano, per la sua maniacale passione per gli spaghetti al tonnno e mollica ma, soprattutto, per quello che mi ha insegnato! Infine grazie a Federica la mia collega fuori sede de "a carne"!

Un ulteriore ringraziamento va a Francesca, supervisore di questa tesi e a Francesco Panella per avermi insegnato soprattutto il vero significato della genetica non relegando questa scienza, ad un gelido contenitore di congetture; non dimenticherò mai le uscite "a pecore" in giro per l'Italia e le infinite storielle raccontate in macchina sulla strada del ritorno.

La mia gratitudine a tutto il personale docente e non docente del Dipartimento di Biologia Applicata per l'aiuto scientifico e morale ricevuto in questi tre anni.

Un grazie particolare a Enrica per aver predetto il futuro!

Grazie a Elio per portare l'allegria nelle giornate di lavoro con i suoi strilli, le sue imprecazioni alla fotocopiatrice e i panini al formaggio rumeno!

Grazie a zio Mario, Loredana, Carlo, Fiorina Raffaele, Livia e Valentino per essere stati sempre fieri di me!

Grazie a Maria Grazia per l'amicizia e la stima che mi dimostra e per avermi accolto in casa sua come un figlio; una grazie sincero anche a Olga e Luisa.

Ohps!!! Un forte ringraziamento a Diego per considerarmi ogni giorno di più un membro della sua specie e per le leccatine (bacetti)!

Un caro ricordo a nonna Minichina che continuerà per sempre ad accompagnare la mia vita.

Mi primer encuentro con la cultura Espanola fue cuando a el aeropuerto de Barcellona estuvo pidiendo un “café caldo”...cuando el camarero me dico que el café solo habia con leche...entendí que mi estancia a Cordoba iba a ser muy enteresante. A llegar en la Universidad de Cordoba no sabia precisamente lo que me havria pasado....mi tutor universitario continuamente me mandava correos diciendo que.... “estoi a Brasil....estoy a Perù...estoy a Tenerife” entonces no cuentava en conocerlo muy pronto!

Durante los dias conocí a Jorge Quiroz con el cual pasè el primer dia con el sentado a lado sin decir una palabra (de verdà yo no sabia ni una palabra de Espanol!)...el tipo riendose, a las 14 horas, mientras se iba a su casa, me dico: “italiano!!!manana mas palabras!!!”. Hoy es mi maestro, mi modelo para el trabjo y mi querido amigo! Mientras, la vida seguia adelante el la “casa del gran hermano” conociendo muchos amigos que agradezco: Angel Valecillo I (el negro y mi maestro personal de salsa), Angel Galarza (Mister Bolivia), Hugo (Mariachi), Pablo (el boludo), Paula (la boluda), Oriol, y Jose Manuel (Joselito o bracho derecho), Oscar, Raquel (la reina de la escalera) y Maria.

En los dias siguiente estuvo practicando el laboratorio y entendí que con Amparo (que descubrí ser una mujer cuando la ví) solo habia la opcion de trabajar!Todavia me quedo amirado como puede organizar todo lo que hace con una precision que hace envidia a los mejores laboratorio del mundo! Gracias a ella y a Josè Luis para la confianza y los conocimiento que me dan todos los dias! Un gracia a todo el equipo del laboratorio de la defenfa para la simpatia y sobretodo a “el Rafa” para dejarme robar sus pipetadores y a Maricarmen para defenderme da el!!!

Finalmente conocí Juanvi y desde ese dia fue una continua sorpresa. Durante los 4 anos que lo conosco me ha enseñado muchas cosas, de la cual la mayoria han servido a mejorar mi vida ante que mis investigaciones.

Yo creo que no conocia Esperanza hasta la ultima vez que me ospitò en su casa...es increible como tiene todos sus familiares abajo de un regime militar!!y todo haciendo su trabajo..seria bueno aplicar su medidas a la politica! Por lo meno todo se quedaria en orden y limpio.

Gracias a todos los amigos de la "RED" por el "espíritu de la red" y los buenos rato que hemo pasado en Latino America! Una gracias particular va a Guadalupe por su amistad y simpatia, a Angelica Stemmer para su ospidalidad...y el elenco seria infinito.

Porsupuesto muchas gracia a mi amigo Roberto Germano y sus chachazas.

Mis recuerdos a los amigos de Portugal: a Luis para su ajuda cientifica y su simpatia y amistad, a Fatima por nuestras charlas sobre ADN, marcadores y quien se recuerda que mas y por todo el ajuda que todavia me da!!! A Nuno y Antonio Vicente y a Catarina (mi profesora de ingles!).

Infine vorrei ringraziare tutta questa fantastica Europa unita nella quale viviamo, per le occasioni e la liberta che ci offre. Il fatto di poter viaggiare in 30 paesi senza nemmeno avere il passaporto è una conquista di civiltà che ci ripaga della sofferenza vissuta dal nostro continente per millenni

Grazie soprattutto a Daniel Allain, Isabelle Palhiere e Maciej Murawski per aver collaborato a questo progetto in maniera disinteressata e preziosa.

INTRODUZIONE

FILOGENESI DELL'OVINO DOMESTICO

Secondo diversi studiosi di filogenesi le attuali razze ovine europee sarebbero derivate dalle popolazioni selvagge dell'Eurasia, domesticate circa 12.000 anni fa e diffuse in Europa con le migrazioni primitive dell'uomo nell'area del Mediterraneo (Ryder 1984). Più precisamente i probabili progenitori della pecora domestica sarebbero *Ovis aries musimon e orientalis* (Muflone Europeo e Asiatico), *Ovis aries ammon* (Argali) e *Ovis aries vignei* (Urial), (Reed 1960; Zeuner 1963). Secondo molti autori proprio *Ovis aries vignei* sarebbe l'antenato del ceppo Merino anche se la tassonomia resta alquanto confusa e controversa (Geist 1991). Nel 1973 nuovi studi effettuati sulle popolazioni selvatiche in base alla loro distribuzione geografica e in base al numero di cromosomi, misero in risalto la presenza di popolazioni con valore intermedio di questi ultimi, fatto che fece formulare l'ipotesi che, le diverse specie di ovini selvatici nel corso dei secoli, abbiano potuto incrociarsi dando vita a nuovi gruppi di individui ibridi (Nadler *et al.* 1971). Questo fece cadere la teoria di una derivazione netta e chiara degli ovini domestici da un solo antenato selvatico (Valdez *et al.* 1978). Anche sulla base di alcune acquisizioni nel campo paleontologico (Reed 1960), si ipotizzarono due differenti linee di domesticazione che interessarono *Ovis aries musimon/orientalis*, che si espanse nell'area Euro-asiatica e *Ovis aries vignei* che si espanse verso il medio oriente, ma verosimilmente in entrambe le linee erano presenti gruppi di individui derivati dall'ibridazione con diverse specie, come *Ovis aries ammon* (Zeuner 1963). Dalle zone del Medio Oriente *Ovis aries vignei* avrebbe colonizzato tutta l'area dell'Europa mediterranea giungendo anche in Spagna attraverso l'Africa settentrionale, grazie al collegamento tra queste due zone, reso possibile in era glaciale dal ritiro del livello dei mari. Più recentemente nuovi lavori svolti sul DNA mitocondriale (*mtDNA*) hanno permesso nuove

acquisizioni in campo tassonomico. Un'analisi della sequenza del citocromo B effettuata da Stefan Hiendleder *et al.* (2002) su ovini domestici e selvatici, mostrerebbe, in accordo con precedenti teorie, la presenza di due differenti cluster di derivazione ammettendo come più probabile progenitore dell'attuale ovino domestico *Ovis aries orientalis/musimon* (Muflone asiatico ed europeo). Il muflone Europeo, si sarebbe originato da ovini addomesticati in età Neolitica e successivamente inselvaticati (Vigne 1999). Inoltre, le distanze genetiche emerse escluderebbero un'influenza dell'*Ovis aries vignei e ammon* sull'ovino domestico che deriverebbe in definitiva esclusivamente dall'*Ovis aries musimon/orientalis*, tali affermazioni devono comunque tener conto dei limiti dell'analisi del DNA mitocondriale che non considera influenze di altre popolazioni selvagge per via maschile (MacHugh *et al.* 1997).

LA RAZZA MERINO

❖ **Storia e origine**

In accordo con la tesi che esclude la partecipazione dell'*Ovis aries vignei*, secondo alcuni autori (Esteban 2004) il ceppo Merino deriverebbe dall'*Ovis aries tudertanus* (dall'antico nome della Tudertania, corrispondente all'attuale regione dell'Andalusia), allevato dalle antiche popolazioni preispaniche intorno al 1000 a.C., definendo così il luogo della nascita della razza Merino alla Penisola Iberica. In realtà sulla vera origine non è stata fatta ancora chiarezza, infatti per alcuni questa popolazione sarebbe proveniente dall'Africa soprattutto in base al suo nome, che potrebbe derivare da quello della tribù dei Beni-Merines; in base a questa ipotesi sarebbe arrivata in Spagna all'incirca nell'anno 1146 d.C. con le prime invasioni dei Mori; questa teoria che sarebbe avvalorata dal trattato sull'agricoltura dello scrittore arabo Zacarias Ahmed che visse in Andalusia precedentemente a questa data il quale non si fa alcuna menzione del nome "Merino" o di ovini da lana (Klein 1920). Nonostante ciò l'origine Iberica della razza sarebbe la più accreditata. Infatti, già in epoca

romana, Plinio il Vecchio e Marziale parlano di lana spagnola di eccezionale finezza, mentre Strabone dice nel Geografia, riferendosi alla lana Spagnola: “...questa lana è di bellezza insuperabile, e un ariete da vita lo si può pagare un talento” (Strabone.). Sempre di epoca romana è una rappresentazione su un sarcofago romano, ritrovato a Cordoba, di un ariete dai tipici tratti merino. Ma le testimonianze della presenza in Spagna sono addirittura antecedenti, infatti, nel 1981 nella località di Villafranquilla fu ritrovata una statuetta bronzea del V secolo, rappresentante un ariete con corna a spirale e lana estesa, avente secondo molti esperti le tipiche caratteristiche del ceppo merino. Sicuramente in epoca romana, nella Spagna di recente conquista, si allevavano ovini dalle eccezionali qualità laniere e si curava attentamente la selezione per questo carattere, come scrive lo storico Columella (Cadiz 3 a.C.) nel *De Re rustica*. In base a questa fonte in Spagna erano già presenti ovini dalla lana fine di colore bruno che vennero incrociati con arieti africani per poter ottenere un colore bianco del vello e successivamente con ovini tarantini per contrastare la perdita della finezza e della morbidezza (Columella). Dal Medioevo la storia della Merino diviene strettamente legata a quella della Spagna. Infatti, capito il grande potenziale della razza, lo stato spagnolo detenne il completo monopolio sia sull'allevamento sia sull'esportazione e vendita dei prodotti lanieri. Ciò si deve all'immenso valore che la lana assunse in epoca medioevale e rinascimentale per la fabbricazione di tessuti; in diversi documenti si attesta come i laboratori tessili fiorentini pagassero ingenti somme per una partita di “lana de Spagna”, infatti, da alcuni scritti dell'epoca sappiamo che in valore di cambio, un kg di *lana de Spagna* corrispondeva in valore a svariati kg di formaggio di pecora (Hideyoshi 1980). Nel XIII secolo Alfonso il Saggio istituì l'*Honorado Concejo de Mesta*, allo scopo di proteggere e incoraggiare la transumanza della Merino. Questa si eseguiva su percorsi stabiliti, detti “*Cañadas reales*” i quali si spingevano dalla regione di Aragona fino alle zone dell'Andalusia ed Estremadura dove gli ovini erano portati nel periodo invernale. Durante il governo dei Re Cattolici la Mesta raggiunge il suo massimo potere poiché vennero proclamate delle leggi di stampo protezionistico come l'obbligo di restituzione alla pastorizia di terre agricole o l'obbligo a tutti i

sudditi e a tutti i centri abitati di non ostacolare la transumanza. In questi anni la monarchia stabilisce che la vendita e il commercio all'estero di capi merino o della stessa lana possono avvenire solo dopo autorizzazione reale. Tra il XV e il XVI secolo, la consistenza nazionale raggiunse i 3.000.000 di capi, questo numero, però, discese quasi a un terzo durante l'ultimo secolo, come conseguenza dell'espansione agricola, della crisi dell'industria tessile e della perdita d'interesse da parte dei regnanti per il sostegno al settore. Il declino della Merino in Spagna si fece più forte con l'espansione della razza nel resto del mondo a causa anche della progressiva scomparsa della Mesta. Con il declino del prezzo della lana, dovuto alla comparsa di sostituti sintetici, venne meno l'interesse principale per cui era allevata la razza, costringendo i produttori ad effettuare un intenso lavoro selettivo atto a convertirla verso un animale a prevalente produzione di carne, utilizzando non di rado incroci con razze da carne straniere senza un ben preciso piano selettivo (Delgado *et al.* 1998).

❖ **Caratteristiche di razza**

Il profilo fronto-nasale è retto o subconcavo nelle femmine, subconvesso o convesso nei maschi; le proporzioni medie e la taglia sono variabili secondo il sistema e l'area di allevamento. La testa è ampia, corta e presenta una leggera depressione della linea fronto-nasale; gli occhi sono vivi e grandi, la fronte ampia, le narici sono larghe con una o più pieghe cutanee sopra gli zigomi nei maschi, la bocca è grande con labbra grosse, le orecchie sono piccole e portate orizzontalmente. Le corna, quando presenti, nei maschi sono forti, a superficie finemente striata, spiraliformi e a sezione triangolare; le femmine ne sono sprovviste o ne presentano accenni rudimentali. Il collo è corto. Il tronco è di lunghezza media, il garrese è ampio e non si distingue dalla linea dorso lombare, la spalla è rotonda e ben proporzionata, il dorso e i lombi sono rettilinei, il costato arcuato, il ventre ben proporzionato e il petto sceso il più possibile. Gli arti si presentano vigorosi e con appiombi corretti. La pelle e la

mucosa apparente sono di color rosa chiaro, con assenza di pigmentazione; nelle parti nude il pelo è di colore bianco, morbido e con riflessi setosi. Il vello è bianco e serrato, molto esteso e copre tronco, collo, fronte, guance, ventre, scroto e gli arti fino ai garretti; i bioccoli si presentano di lunghezza media e rettangolari, le fibre lanose sono molto fini, elastiche, resistenti, molto ondulate e frequentemente con lanolina bianca o giallastra. La qualità che maggiormente contraddistingue la pecora Merino è la sua rusticità che le permette di vivere in un ambiente difficile, con temperature che in estate superano facilmente i 40° C e in cui l'abbondanza di pascolo in primavera contrasta con la pronunciata scarsità estiva. Questa capacità di adattamento le ha permesso di insediarsi in tutto il mondo. Interessante è anche il suo istinto molto gregario, che fa sì che il gregge si sposti sempre compatto. Il sistema di allevamento al quale è stata sottoposta la razza Merino per secoli, insieme alla sua propensione attitudinale quasi esclusivamente rivolta verso la produzione di lana, le ha conferito un'immagine molto diversa da quella reale; tradizionalmente, infatti, la pecora Merino era coperta per la prima volta a diciotto o più mesi di età, ed è stata per questo da molti considerata una pecora dalla maturazione sessuale tardiva. Attualmente si preferisce fecondare le pecore a quattordici mesi e sono stati registrati casi di femmine che cominciano la loro gestazione a 5 mesi di età, con parti normali ed agnelli vitali. La fecondazione può aver luogo in tutti i periodi dell'anno, visto che ha la capacità di presentare ciclo ovarico continuo, fatta eccezione per le greggi che transumano, dove la stagione delle fecondazioni si limita ai mesi di Giugno-Luglio. In un elevato numero di greggi si ha un interparto di otto mesi, che permette di avere tre parti in due anni, anche se nell'allevamento tradizionale nei pascoli dell'Estremadura e dell'Andalusia si preferisce un solo parto l'anno. Generalmente la prolificità è bassa, aggirandosi intorno al 110-115% ma questo fatto si spiega facilmente se si tiene conto della selezione negativa che questa razza ha subito nel tempo; il fatto che un agnello venisse da un parto gemellare era, infatti, motivo sufficiente affinché si scartasse come riproduttore. È giusto, inoltre, precisare che esistono linee di razza Merino, in

altre latitudini, ad esempio il Boorola, nel quale è stato selezionato questo carattere e che sono considerate molto prolifiche.

❖ **La produzione di carne**

La razza Merino è stata considerata per molto tempo come adatta esclusivamente alla produzione di lana. Gli agnelli erano sacrificati in età avanzata, sottoposti ad un regime alimentare spesso insufficiente e si diceva, inoltre, che la carne aveva un sapore troppo accentuato. Adesso, sottoponendo gli agnelli a un regime alimentare adeguato, sacrificandoli all'età di 90-120 giorni, con pesi vivi di 24-30 kg e più, si ottengono carcasse di buona conformazione e qualità con grado idoneo d'ingrassamento; la carne possiede, inoltre, un bouquet pari a quello di altre razze a eccellente attitudine carne. Gli incrementi ponderali giornalieri, per agnelli compresi fra 15 e 30 kg e sottoposti a finissaggio, sono di 240-250 grammi e la resa al macello è variabile con il sistema di allevamento.

❖ **La produzione di lana**

La Merino è senza dubbio la razza da lana per eccellenza; la grande estensione del vello, che raggiunge limiti mai superati in nessun altro tipo genetico, la buona uniformità, senza difetti di giarra o pelo morto, l'elevata densità del vello, l'eccellente finezza delle fibre, la loro ondulazione e resistenza, la rende, infatti, la migliore pecora per quest'attitudine.

Le principali caratteristiche della lana prodotta sono riportate in tabella 1.

Finezza	Micron	16-24
Lunghezza	cm	7-9
Peso del vello	kg	2,5-5
Resa in lana lavata	%	35-43

Tabella 1: principali caratteristiche della produzione di lana del Merino Spagnolo

LE PRINCIPALI RAZZE EUROPEE.

❖ **La Merino Portoghese**

Probabilmente in Portogallo l'introduzione della Merino avvenne in maniera analoga a quella che caratterizzò le prime importazioni di questi animali nel sud della Francia.

Sono note, infatti, molte introduzioni nello stesso periodo in cui ciò avveniva in Francia e Germania, ma è logico pensare che data la stretta vicinanza di Spagna e Portogallo e l'assenza di veri e propri confini naturali, ci fosse un continuo intercambio di animali tra i due paesi.

Se consideriamo poi l'ipotesi più accreditata sull'origine del Merino nella penisola Iberica in epoca preromana, si può facilmente intuire che probabilmente il Merino, fosse allevato anche nel sud del Portogallo in epoca romana, quando la provincia Baetica comprendeva gran parte dell'odierna Andalusia e dell'Alentejo (regione del sud del Portogallo).

Nei giorni nostri le razze di ceppo Merino in Portogallo sono tre: la Merino de Beira Baixa (figura 11 e 12), la Merino Branco (figura 14) e la Merino Preto (figura 13).

La prima, la Merino de Beira Baixa, è una razza di recente costituzione ufficiale. Infatti, è stata riconosciuta nel 1870 e sembrerebbe che la sua origine sia da far risalire direttamente al Merino Spagnolo.

Rimangono comunque molte ipotesi sulla sua vera origine. La più accreditata di queste vuole l'inizio di questa razza dagli ovini "*bordaleiros*" della zona di Nisa, Gavião e Castelo de Vide. A conferma ci sarebbe la seguente testimonianza scritta nel 1870 nel *Recensamento Geral de gados* : "Si deve osservare che tra gli ovini *bordaleiros*, sia bianchi che neri sia avvicinano per morfologia al Merino, talvolta per diretto intervento di questa razza ..." (1970).

Per questa ragione il Merino da Beira Baixa si sarebbe originato dal miglioramento di Merino Spagnoli con ovini Bordaleiros delle suddette regioni.

Per quanto riguarda l'altra razza Merino portoghese, il Merino Branco, non ci sono notizie storiche importanti. Secondo l'opinione comune sarebbe originata dall'allevamento e acclimatemento del Merino Spagnolo in Portogallo dal quale deriva direttamente. Molti autori di contro riferiscono che durante la fine del 1800 si sia proceduto al miglioramento con animali di razza Rambouillet e D'Arles.

L'ultima razza, il Merino Preto, è un Merino che presenta la particolarità di avere il colore del vello nero. Un tempo apprezzato per la notevole adattabilità a condizioni difficili e per un certo uso che si faceva della lana, che non aveva bisogno di colorazione, è oggi in notevole diminuzione numerica. Secondo alcuni autori (Sobral *et al.* 1991) sarebbe ciò che rimane del Merino più antico, risalente addirittura al tempo della selezione che i Romani attuarono in favore del colore bianco del vello.

❖ ***Le Merinizzate italiane***

L'introduzione della Merino in Italia avvenne nell'anno 1435 quando entrò in Puglia e, più precisamente, nella Daunia (Capitanata), essendo l'Italia meridionale sotto il dominio spagnolo (Alfonso I di Aragona) ebbe così origine la più antica delle razze italiane di derivazione Merino: la Gentile di Puglia (figura 21 e 22). In passato si adottò la pratica della transumanza, al pari della sua progenitrice spagnola (Analla *et al.* 1998), che si svolgeva dal Tavoliere delle Puglie all'Appennino abruzzese (Tortorelli 1984; Negrini 1989). Era tenuta in grande considerazione per la grande qualità della lana che era in grado di produrre in un ambiente non facile; raggiunse negli anni precedenti la seconda guerra mondiale, una consistenza di oltre un milione di capi, anche in conseguenza del fatto che furono assimilate a essa molte popolazioni merinizzate della zona dell'Irpinia, del Sannio e della Calabria con caratteristiche disomogenee come la Gentile di Calabria, la Gentile Lucana, la Quadrella o Bastarda spagnola, la pecora del Castello di Alife, la Petraiola, la San Giorgio, la Marcone e la Molara (Tortorelli 1984; Sarti 1996).

Le importazioni comunque furono numerose sia nel nord che nel sud della Penisola: infatti in epoca napoleonica il generale Murat, eletto successivamente re di Napoli, importò direttamente dalla Spagna, probabilmente come bottino di razzie 100 capi di razza Merino (Sanchèz 1986).

Di taglia media con peso di 65 kg negli arieti e di 45 kg nelle pecore, presenta testa con profilo leggermente montonino nei maschi, rettilineo nelle femmine; corna robuste e a spirale regolare sono presenti negli arieti. Il tronco è lungo e mediamente largo con vello bianco serrato, a lana fine, costituito da bioccoli prismatici.

Il peso alla nascita dell'agnello è in media sui 3,7 kg, quello a novanta giorni è di 22 kg. La produzione media di lana in sudicio degli arieti è di 6 kg e delle pecore di 3,5 kg. La fertilità è del 90% e la prolificità del 120% (Sarti *et al.* 2002).

Sporadicamente si utilizza il latte per la produzione di ottimi formaggi tipici (Canestrato, Pecorino), come tentativo di integrare lo scarso reddito proveniente da lana e carne.

Un'altra importante importazione di Merino fu fatta tra il XVIII e il XIX secolo nel territorio dell'allora Stato Pontificio, dove l'allevamento ovino era tenuto in grande considerazione poiché unica fonte di approvvigionamento di carne per la città di Roma.

Già nel 1402 Bonifacio IX, emanò diverse leggi a favore della pastorizia e della pratica della transumanza, che a causa dell'instabilità politica dei secoli precedenti, non si era potuta affermare. È del secolo XVII la bolla pontificia della "*Dogana dei Pascoli*" che proteggeva le vie di spostamento delle greggi tra l'Appennino e la Maremma.

Ma l'arrivo dei primi capi Merino iniziò nel XVIII secolo, il Papa Pio VI (figura 26) ordinò di importare nella tenuta di Pescia in Montalto un gregge di pecore Merino che arrivavano a centinaia nello stato della Chiesa (il Merino aveva il carattere di dono per i principi Spagnoli). Questi erano utilizzati su quasi tutte le greggi per migliorarne le produzioni.

Il pontefice intuì la grande importanza per l'industria laniera, proibì la macellazione degli agnelli di qualsiasi sesso, ordinando che l'eccedenza fosse

messa a disposizione della Reverenda Camera Pontificia per la successiva diffusione in tutto lo Stato. Uno dei più importanti fautori della diffusione di questa pecora fu il Piscini, allevatore che essendo vicino alle sfere ecclesiastiche non aveva difficoltà a procurarsi animali di sangue Merino. In questa prima fase avvennero numerosi incroci di sostituzione sulla razza locale dell'Appennino la Vissana.

Non è chiaro se le Merinos furono allevate in maniera separata dalle razze locali o se utilizzate in incrocio con le stesse razze locali, è certo però, che il numero di animali importati dalla Chiesa fu elevatissimo ed è quindi da supporre che molti degli animali di tipo merino attuali, siano in effetti, diretti discendenti dei loro progenitori Iberici.

L'area di allevamento di questa nuova razza, la Sopravissana (figura 17, 18, 19 e 20) si estese dalle Marche, all'Umbria, al Lazio, alla Toscana e all'Abruzzo raggiungendo circa il milione di capi.

La selezione fu improntata verso la produzione di lana di qualità, inoltre la razza produceva “*l'abbacchio romano*” cioè un agnello macellato a 30 - 40 giorni di età e dal suo latte si otteneva il *Formaggio romanesco*; si può in ultima analisi definire la sopravissana, una razza a triplice attitudine. Di taglia media con peso di 65 kg negli arieti e di 45 kg nelle pecore, testa proporzionata con corna robuste e a spirale aperta nei maschi, acorne nelle femmine. Il tronco è relativamente lungo, il petto largo, il torace robusto. Il vello è bianco, serrato, costituito da bioccoli prismatici. Il peso alla nascita dell'agnello si aggira in media sui 3,7 kg e quello a novanta giorni è di 22 kg. La produzione media di lana in sucido è di 6,5 kg negli arieti e di 4,5 kg nelle pecore. La fertilità è del 90%, la prolificità del 130%. La produzione di latte oggi meno sfruttata, offre una valida integrazione per l'allevatore (Sarti *et al.* 2002).

Con il mutare delle condizioni economiche nel periodo che seguì il 1970, fu inapplicabile il metodo tradizionale di allevamento basato sulla transumanza. Inoltre, la naturale propensione alla produzione di lana di qualità non trovava sbocco commerciale sul mercato europeo che, come già detto, si rivolgeva ai produttori extraeuropei che garantivano grosse partite con una certa costanza.

Tutto ciò ha causato una grave riduzione numerica delle due razze merinizzate dagli anni '30 che le ha portate dagli 1.300.000 capi del 1967 alle poche migliaia attuali, tanto da essere oggi inserite tra le razze in via di estinzione.

Parallelamente si assistette a una continua opera d'incrocio con tipi genetici differenti ai fini di riconvertire queste razze ad attitudini più favorevoli; operazione che fu condotta, c'è da dire, senza una precisa strategia selettiva, portando al progressivo inquinamento genetico della popolazione. Anche in Francia i primi sintomi della crisi si avvertirono alla fine del 1800 e s'interveniva per costituire nuove razze a preminente attitudine carne partendo dalla Rambouillet e dalla Merino Spagnola; ne sono un esempio l'Ile de France (Dishley x M. R.), la Berrichone du Cher (Dishley x Southdown x M.R) e la Charmoise (Romney March x M.R.).

Ebbe così inizio la costituzione delle razze cosiddette merinos-derivate da carne, mentre le razze merinizzate più specializzate per la produzione di lana si contrassero numericamente.

In Italia le razze adoperate per il meticciamiento furono soprattutto razze da carne straniere come la Merinos Precoce tedesca o Württemberg, le francesi Ile de France e Merinos Precoce, la Suffolk, la Dorset e la Texel, ma anche razze italiane come la Bergamasca, l'Appenninica, il Trimeticcio di Segezia, e non di rado razze di tipo respiratorio come la Sarda e la Massese (Pollidori *et al.* 1989). La priorità principale era aumentare la resa in carne degli animali e tutte le caratteristiche favorevoli a questo carattere, ottenendo risultati inizialmente notevoli, tanto che lo stato finanziò l'acquisto di riproduttori dall'estero. Non mancarono, inoltre, tentativi di orientarsi verso una certa produzione del latte. Ciò nonostante, gli arieti di razze esotiche mal si adattavano all'ambiente difficile dei pascoli italiani e presentavano problemi riproduttivi per lo scarso adattamento al clima, con un'evidente riduzione della poliestralità nella popolazione. Infatti, per ridurre il costo di allevamento, gli incroci industriali erano spesso utilizzati come riproduttori provocando una progressiva perdita di rusticità degli ovini. Inoltre le ottime performance dei soggetti europei si esprimevano solo a pesi superiori a quelli richiesti dal mercato italiano, più orientato su carcasse medio - piccole.

A causa della completa assenza di norme tecniche di selezione unitamente ai problemi sopra esposti si ottenne una popolazione polimeticcia che non era ben ascrivibile a nessuno dei tipi genetici originali (Sarti 1996), situazione propria di molte razze italiane. Ciò fece sì che i prodotti ottenuti erano, in virtù delle molte tipologie genetiche utilizzate, molto diversi e incostanti.

Nel 1992 si decise infine di ricavare da questa grande popolazione meticcica una nuova razza tramite una serie d'interventi atti a inquadrare gli individui in un determinato standard razziale. Il lavoro selettivo svolto dall'allora Istituto di Zootecnica Generale dell'Università degli Studi di Perugia, fu rivolto soprattutto allo studio della situazione etnografica della popolazione per poi avviare su questa un'intensa azione rivolta a renderla omogenea dato che presentava, vista l'ampia base genetica da cui derivava, una grande variabilità biometrica e produttiva. Tale lavoro portò alla costituzione della razza Merinizzata Italiana (figura 24).

Dato il deficit di auto approvvigionamento nel settore della carne ovina italiana (oggi oltre il 60 % del fabbisogno nazionale è importato), si è cercato di rivolgere il miglioramento genetico del nuovo tipo, verso la produzione della carne senza esasperare tale carattere, per non pregiudicare la rusticità propria della popolazione. Una particolare attenzione è stata rivolta anche alla conservazione della qualità della lana per non discostarsi troppo dal ceppo merino da cui trae origine.

La razza Merinizzata Italiana ha una consistenza stimata intorno ai 300.000 capi, presenta una taglia medio - grande con peso di 80 kg negli arieti e di 55 kg nelle pecore. Testa proporzionata acorne sia nei maschi sia nelle femmine. Tronco lungo, largo e tendenzialmente cilindrico. Il vello è bianco serrato nei maschi e serrato o semichiuso nelle femmine. Il peso alla nascita dell'agnello è in media sui 4 kg, quello a 90 giorni 25 kg. La fertilità è del 95% e la prolificità del 130% (Sarti *et al.* 2002).

❖ ***La Polski Merino***

La più grande popolazione appartenente al ceppo merino presente in Polonia è senz'altro la Polish Merino (figura 15 e 16). Questa razza fu costituita in seguito ad alcune importazioni di animali effettuate nel 1786 dalla Spagna che furono in seguito migliorate con numerose importazioni di animali provenienti dalla Francia, come il Rambouillet e il Merino Precoce. Nei primi anni del 1900 continuarono numerose importazioni di animali di sangue Merino, come il Merino Elettorale dalla Germania, con la volontà di selezionare una razza a duplice attitudine (carne e lana).

Il processo di formazione del tipo genetico continuò durante gli anni con numerose influenze di razze di diverso tipo. Infatti, durante il periodo che va dal 1918 al 1939 al fine di migliorare la produzione di carne anche in vista della tendenza generale del mercato europeo della lana in forte crisi, si praticarono numerosi incroci con le razze Meleschaf e Ile-de-France anche se lasciarono poca traccia nella popolazione finale.

Ben più importante fu l'importazione e l'incrocio con animali di provenienza tedesca come la Landschaf e Fleischschaf nell'immediato dopo guerra nei greggi sopravvissuti alle distruzioni del conflitto. Nei giorni nostri la Polish Merino è la razza più numerosa in Polonia; sono presenti circa due milioni di animali che rappresentano il 40% circa degli ovini allevati nel paese con circa 400.000 femmine iscritte al Libro Genealogico. In diversi allevamenti la razza è classificata a triplice attitudine, allevata quindi oltre che per la lana e la carne anche per una certa produzione di latte. E' soprattutto diffusa nella parte Est del paese in zone pianeggianti e collinose. E' apprezzata soprattutto per la sua precocità e la stagionalità degli estri, che unitamente ad un fortissimo istinto gregario, ne fanno un'ottima razza adatta ai più diversi metodi di pascolamento.

❖ ***La Merino Francese***

Se la Spagna è stata la culla della Merino, alla Francia si devono senz'altro la sua espansione e miglioramento. La presenza del Merino nel territorio francese inizia ufficialmente nella seconda metà del 1700, anche se testimonianze storiche la fanno risalire ad almeno 100 anni prima. Infatti, nella zona di confine con i Pirenei si trovavano fin dal Medioevo zone di pascolo transumante del merino spagnolo che sconfinavano dal normale limite dello stato per addentrarsi nei pascoli estivi Francesi, dove avrebbero lasciato traccia nella formazione di razze locali, in maniera clandestina rispetto alle regole della Mesta. Inoltre nel 1659, dopo il trattato della Pace dei Pirenei, la Spagna dovette cedere il territorio del Roussillon che faceva parte del casato di Barcellona. Ovviamente tutte le masserie che allevano la Merino passarono sotto il dominio franco (Wikipedia) e furono sicuramente alla base della formazione della razza Merino D'Arles (figura 5, 6 e 7).

Ma il vero inizio dell'allevamento del Merino in Francia comincia approssimativamente nel 1725 quando il ministro Colbert prese l'iniziativa dell'acquisto di un nucleo selezionato di animali di razza merino dalla zona di Siviglia. Ciò derivò dal fatto che le autorità del settore in Francia si erano lamentate, tra cui il signor Tissier, ispettore generale degli allevamenti statali, che fu il principale artefice dello sviluppo della razza in Francia, che dalla Spagna, anche a causa del carattere non ufficiale delle importazioni, erano arrivati solo animali di pessima qualità che non rappresentavano un buon punto di partenza per l'allevamento.

Per diversi anni e a più riprese (1750, 1752, 1768) numerose importazioni si susseguirono verso la zona di Roussillon per migliorare la popolazione merino già esistente (Sanchèz 1986).

Fu durante il regno di Luigi XVI che l'intendente alle finanze dello stato, Trudaine, intesa l'enorme importanza che poteva avere nel settore tessile lo sviluppo dell'allevamento della razza Merino, incaricò il professor Daubeton della scuola di veterinaria di Alfort (Parigi) di dare inizio ad un'intensa sperimentazione, volta a sondare la possibilità effettiva di acclimatamento del

Merino, anche nelle regioni continentali della Francia. Il suo lavoro inizia veramente sulla razza Merino quando nel 1776 il governo gli fornisce un gregge di 2000 capi provenienti da diverse aziende spagnole, da destinare alla stazione sperimentale di Coutangis.

Daubeton conduce una vera e propria opera di selezione e gestione dei nuovi tipi genetici ottenendo linee di sangue adatte all'allevamento francese; tanto era noto il suo lavoro che il Re di Sassonia e il duca di Württemberg (di cui parleremo ancora) inviarono alla stazione numerosi pastori ad apprendere l'arte di migliorare la produzione della lana.

Ormai dimostrata la capacità di adattamento del Merino e la sua capacità di continuare a produrre lana di qualità ottima come già accadeva in Spagna, il Re Filippo XVI (1754-1793) sotto consiglio di Tissier, nel 1783 trasformò la tenuta di Rambouillet in una stazione sperimentale per lo sviluppo della razza Merino in Francia. Fu così che il re in persona scrisse di proprio pugno a suo cugino il re di Spagna, Carlo III, per avere il permesso di acquisire un gregge di Merinos Spagnoli dalla zona di Segovia (*Castilla y Leon*). Non si sa bene se fu un vero acquisto o, come tramandano alcune fonti (tra le quali gli allevatori che cedettero gli animali), si trattò di un vero e proprio dono del re di Spagna al re di Francia, fatto sta che si trattò di animali di notevole qualità e di splendida finezza del vello, caratteristiche richieste dallo stesso monarca francese nel suo documento.

L'insieme degli animali riunito a Villacastrin (Segovia) nel 1786, era composto di 334 pecore e 42 arieti provenienti da alcune aziende il cui nome rimase famoso: Escorial, Negrete, Alcolea, ecc.

Al comando di Don Andres Gil che aveva ricevuto l'incarico ufficiale di gestire l'acquisto, quattro pastori condussero gli animali, attraversando Navarra e poi St. Jean de Pied de Port e Orleans fino a Rambouillet. Tutti i cittadini che vivevano nel luogo di transito avevano obbligo di "...dare da bere e da mangiare ai preziosi Merinos.", rilevando l'immensa importanza strategica che aveva questa importazione per il paese.

Le importazioni di animali furono comunque protratte per molti anni per raggiungere il culmine durante la Rivoluzione Francese. Infatti, nel 1795 con la

ratifica del trattato di Basilea, la Spagna fu costretta a cedere diverse centinaia di capi di bestiame alla Francia, tra i quali circa 5500 ovini di razza Merino che andarono a formare differenti aziende e a rimpinguare gli animali presenti nella tenuta di Rambouillet, che fu chiamata con il nome di Bergerie Nationale per il quale è ancora famosa.

Le vicende storiche dell'Europa di allora contribuirono all'espansione straordinaria del Merino. Durante le razzie dell'esercito di Napoleone compiute in territorio spagnolo, numerosi altri capi di questa razza furono trafugati in Francia, finché agli inizi del 1811 si contavano 200.000 capi di razza pura e più di due milioni tra incroci e meticci.

Con il passare degli anni il Merino selezionato nella Bergerie Nationale si diffuse in tutta la Francia e fu apprezzato, non solo in Francia, per la produzione di lana fine ed è conosciuto tutt'oggi come Merinos Rambouillet (figura 3 e 4).

Una curiosità etimologica sul nome deriva proprio dall'allevamento della razza in Francia, dove si chiamavano questi animali con il termine plurale derivato dalla lingua spagnola, Merinos per l'appunto (plurale di Merino), termine che è rimasto per definirla fuori dei confini spagnoli.

Parallelamente al programma nazionale di selezione abbiamo visto però che seguirono diverse importazioni che formarono in epoca più remota la già citata Merinos D'Arles. Ma negli stessi anni, per opera di gruppi di allevatori delle pianure centrali francesi s'iniziò un piano di miglioramento del Merino Spagnolo per la mole e per la precocità di accrescimento, scelta dettata dal mercato che richiedeva sempre più carne e dalla necessità di trovare delle alternative ai tipi genetici anglosassoni, ma non sempre disponibili per gli attriti politici tra le due nazioni. La base di partenza furono gli animali delle prime importazioni dalla Spagna in seguito selezionati in tre differenti regioni dalle quali presero il nome, le relative varietà: Chatillonnais, Soissonnais e Campenois. Questi tipi di Merinos furono definiti Precoci o Merinos Precoci Francesi per distinguerli da quelli Tedeschi. In verità con il nome di *Merinos precoci* s'intende, in molti, casi un'ampia gamma di razze che derivano in purezza dal Merinos Spagnolo ma che si distinguono da esso per il

miglioramento di alcune caratteristiche come la lana, la carne o la precocità di sviluppo. Ma, di fatto, la Merinos Precoce rappresenta un'entità razziale ben distinta (figura 23).

Le tre varietà si originarono, come già detto, dalle prime importazioni di Merinos Spagnoli selezionati per una produzione spiccata di carne. La più famosa varietà, la Merinos Precoce de Chatillonnais fu selezionata di Merino introdotti da Daubenton nell'azienda di Courtangis, già citata in precedenza.

E' stata una razza esportata in molti paesi per il miglioramento della produzione di carne di razze locali (vedi Italia) e si è diffusa in maniera preponderante in Spagna dove oggi è allevata in gran numero. E' interessante osservare che il Merino Precoce, creato dai francesi dalla razza spagnola sia poi tornato in più riprese in Spagna ed oggi sia praticamente scomparso in Francia. Il perché di tale ritorno è dovuto al fatto che anche in Spagna si sentiva l'esigenza di migliorare la produzione di carne del Merino ma non si voleva perdere la finezza della lana che durante tutto il dopoguerra mantenne in Spagna un prezzo abbastanza vantaggioso; il Merino Precoce rispondeva a questo bisogno avendo mantenuto una buona finezza della lana oltre ad aver migliorato le caratteristiche di razza da carne. C'è da dire che in molti casi alcuni animali di Merinos Rambouillet entravano a far parte del Merinos Precoce e per molti anni si faceva non poca confusione tra le due selezioni.

Altra razza Merinizzata degna di nota è la Merinos Est-a-laine (figura 8, 9 e 10), nome che gli deriva dalla sua provenienza (Mason 1988), in altre parole la Germania (race de l'Est - a - laine Merinos: Razza dell'est a lana Merinos). Infatti, alla fine del 1800, la regione dell'Alsazia e della Lorena, dove era allevata la Württemberg, passò alla Francia, dove tale razza fu allevata con la finalità di produrre carne.

❖ ***La Merinos Tedesca***

Il processo di sviluppo dell'allevamento della razza Merinos in Germania andò di pari passo con quello della Francia tantoché per diversi tratti coincidono.

Il primo arrivo di ovini spagnoli, consistente in 92 arieti e 128 pecore, si ebbe nel 1765 per concessione del re Carlo III al principe Xavier, Gran Electoral di Sassonia. Come forma di visibilità personale, per far apparire la cosa come un dono prezioso della corona spagnola, il re fece partire questi primi animali dal suo allevamento personale, El Escorial. In realtà secondo altre fonti gli animali provenivano da diverse aziende tra le quali l'Alcolea, el Negrete ecc. Questo primo lotto fu inviato a Stolpen, vicino a Dresda, dove diede origine al famosissimo Merino Electoral. Congiuntamente alla fondazione di questo nucleo in purezza si procedette comunque all'incrocio delle razze locali, fornendo agli allevatori arieti di razza Merino acclimatati. In anni successivi si protrassero altre importazioni di animali dalla Spagna (Sanchez 1986).

Una delle importazioni più rilevanti si ebbe nel 1811 non tanto per il numero di animali, quanto per il successo che ebbe la selezione da essa originatesi. In questa data un famoso allevatore, Fischer, acquistò circa 100 capi Merino in Spagna dall'azienda Campo Alanje, del tipo Negrete. Questo ceppo si espanse e fu selezionato per avere una taglia maggiore e una produzione di lana più alta, al fine di compensare con la quantità il basso prezzo con il quale quest'ultima era venduta; si mantenne comunque vicino a un'ottima produzione di carne anche una straordinaria finezza del vello. Questo tipo di Merino diventerà poi famoso, sotto il nome di "tipo Negretti", e sarà alla base, insieme all'Elettorale di Sassonia, anche del Merinos Australiano. Parallelamente a questo processo il principe Federico il Grande impiantò un proprio nucleo di Merinos, importando circa 2000 capi e lo stesso fecero pochi anni dopo, il principe di Württemberg nel 1788 e il duca di Baden nel 1789.

Nell'immediato dopoguerra la razza Merino è ancora la più importante della Germania e si riscontrano fondamentalmente due tipi genetici: la Merino Fleischschaf (figura 25) e la Merino Landschaf.

La prima si sarebbe originata dal lavoro di Behmer che dal Merino Elettorale selezionò questa razza a duplice attitudine rompendo le convinzioni dell'epoca che reputavano impossibile che un animale di attitudini spiccatamente da carne producesse anche della lana di ottima finezza, anche se trattata con la giusta alimentazione (Horst & Leucht).

La seconda razza tedesca, che ha influenzato enormemente la formazione di numerose razze da carne di origine merino, è la Wurtemberg o Landschaf. Si originò nel sud del Paese dal miglioramento di una razza locale, a vello esteso e poco produttiva, con i Merinos importati a più riprese dai nobili tedeschi (principe Württemberg da cui prende il nome). La denominazione attuale deriva da un termine tedesco che richiama la sua straordinaria capacità come produttrice di carne.

Una terza razza simile al M. Landschaf è la Meleschaf o Leicester che ha perso di importanza rispetto alle prime due pur essendo molto apprezzata in passato come razza miglioratrice (vedi Merino Polacco).

LE MERINOS - IMMAGINI:



Figura 1: ariete di 3 anni di razza Merino Spagnola (EAAP©).



Figura 2: agnella di un anno di razza Merino Spagnola (Emanuela Tullo e Laura Rigazio ©).



Figura 3: ariete di razza Merinos Rambouillet (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).



Figura 4: pecora adulta di razza Merinos Rambouillet (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).



Figura 5: pecora adulta e agnello di razza Merinos D'Arles (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).

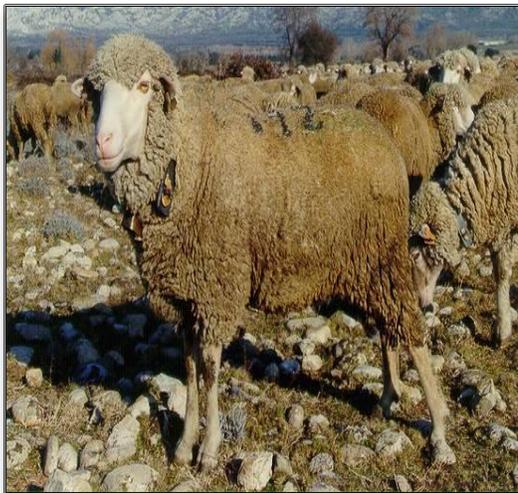


Figura 6: pecora adulta di razza Merinos D'Arles (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).



Figura 7: ariete di razza Merinos D'Arles (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).



Figura 8: pecore di razza Merinos Est-a-Laine al pascolo sulle Alpi francesi (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).



Figura 9: pecora adulta di razza Merinos Est-a-Laine (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).



Figura 10: ariete di razza Merinos Est-a-Laine (UFR Génétique, élevage et re production - AgroParisTech©).



Figura 11: pecore di razza Merino da Beira Baixa (<http://www.ovinosecaprinos.com> ©).



Figura 12: ariete di razza Merino da Beira Baixa (<http://docentes.esa.ipcb.pt> ©).



Figura 13: pecora di razza Merino Petro (<http://www.ovinosecaprinos.com> ©).



Figura 14: pecore di razza Merino Branco (<http://www.ovinosecaprinos.com> ©).



Figura 15: gregge di pecore di razza Merino Polish (Zofia and Mirosław Raczkowski – Poland ©)



Figura 16: Gruppo di giovani arieti di razza Merino Polish (Zofia and Mirosław Raczkowski – Poland ©).



Figura 17: ariete di razza Sopravissana (Prof. Mariano Pauselli ©)



Figura 18: gregge di ovini di razza Sopravissana durante la transumanza (Prof. Mariano Pauselli ©).



Figura 19: agnello di 40 giorni di razza Sopravissana.



Vincenzo Landi ©

Figura 20: pecore e agnelle di razza Sopravissana (Vincenzo Landi ©).

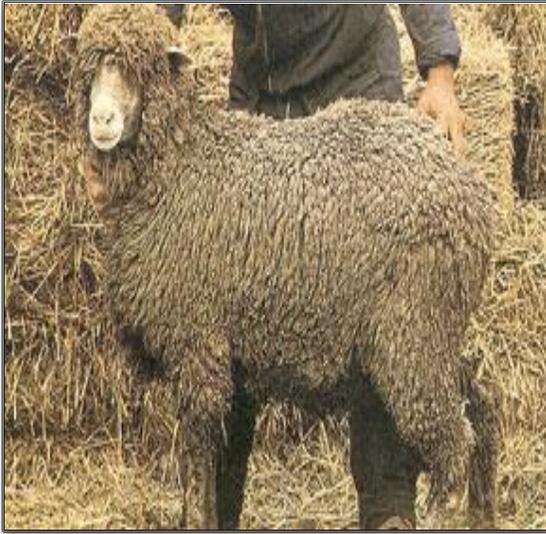


Figura 21: pecora di razza Gentile di Puglia (Lane d'Italia ©).



Figura 22 ariete di razza Gentile di Puglia (Assonapa ©).



Figura 23: ariete di razza Merinos Precoce (UFR Génétique, élevage et reproduction - AgroParisTech©).



Figura 24: ariete di razza Merinizzata Italiana Gentile (Assonapa ©).



Figura 25: ariete di razza Merinos Fleischaf (*Università di Còrdoba - Produccion Animal*).

NOTIFICAZIONE



La Masseria di Pecore Spagnole, fatte venire da Spagna dall' Immortale Pio Sesto per migliorare tutte le Lane dello Stato, fu con suo Chirografo segnato li 29. Agosto 1792. diretto all' Eminentissimo Sig. Cardinale Ruffo allora Tesoriere Generale, affidata dalla Rev. Camera Apostolica all' Enfiteuta Camerale del Campo Pescia, con legge di allevarle, e moltiplicarle, onde poter un giorno con i Maschi di detta Masseria migliorare le altre tutte dello Stato,

Ci ha ora notificato l' Enfiteuta suddetto, e con nostra soddisfazione abbiamo inteso, che la detta Masseria di Pecore Spagnole, in seguela dell' obbligo ad esso addossato, si è talmente moltiplicata, che puole già somministrare i Padri a varie altre Masserie dello Stato, il che potrà continuare anche negli anni avvenire.

Per comune regolamento si avverte di essersi già verificato, che dando i Padri Spagnoli alle Pecore Nostrali, i Figli vengono di Lanaggio simile ai Padri, e replicando con attenzione questa operazione alla terza generazione vengono i Figli del Lanaggio perfettissimo de' Padri Spagnoli, cosichè dando i Padri Spagnoli alle Nostre Pecore possono tutte le Masserie dello Stato ridursi alla finezza del Lanaggio Spagnolo.

La sperienza inoltre di quattordici consecutivi anni ha dimostrato, che detto Lanaggio non degenera nel nostro clima, e che una Pecora Spagnola da il doppio in peso di Lana delle nostrali, e si vende molto più la Lana delle prime, che l'altra delle nostre Pecore.

Quindi desiderosi Noi di promuovere il maggior vantaggio in questo ramo d'industria Nazionale affidata dal menzionato Sommo Pontefice alla R. C. A., ed ai Tesorieri Generali pro tempore ad istanza del suddetto Enfiteuta notificiamo a tutti li Padronali di dette Masserie di Pecore Nostrali, che volendo migliorare le proprie Masserie si diriggano a detto Enfiteuta in Roma, o al di lui Vergaro in Montalto per procurarsi i Padri per le rispettive loro Masserie, onde migliorare in tal modo li loro Lanaggi, ed aumentare le loro rendite annuali.

Dalla Nostra Residenza di Monte Citorio li 20. Dicembre 1804.

Alessandro Lante Tesoriere Generale

Die, Mense, & Anno, quibus supra supradicta Notificatio affixa, & publicata fuit ad Valvas Curie Innocentianae, in Aedibus Campi Florae, ac in aliis Locis solitis, & consuetis Urbis per me Josephum Pelliccia Apost. Cur. Felix Castellaeci Mag. Cur.

IN ROMA presso Lazzarini Stampatore della R. C. A. 1804.

Figura 26: documento di notifica degli affari dello Stato della Chiesa che attesta l'allevamento della Merino nel Centro Italia.

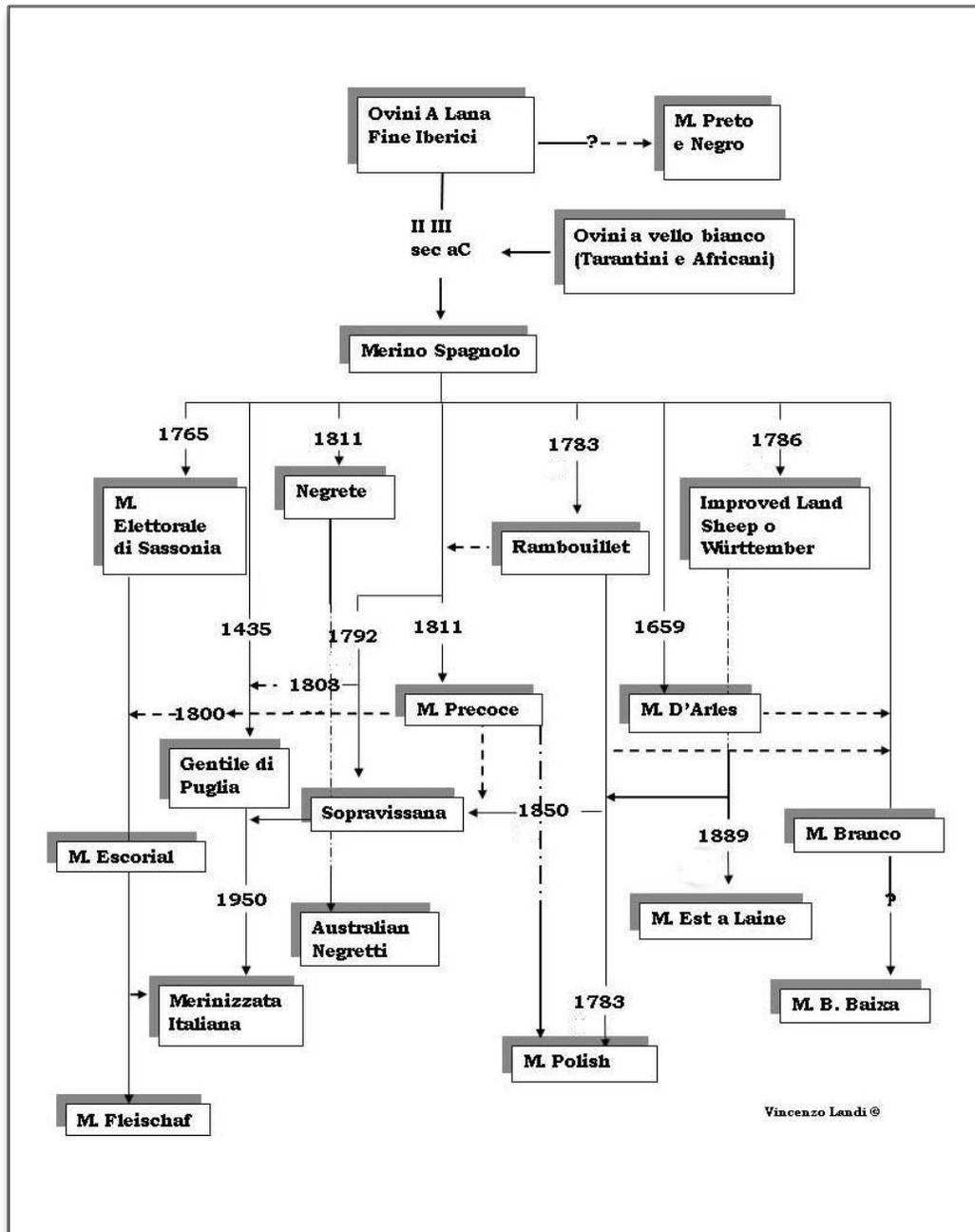


Figura 27: diagramma temporale dell'espansione del Merino in Europa, le linee tratteggiate (---) indicano movimenti di animali sporadici e non ufficiali (Vincenzo Landi ©).

L'IMPORTANZA DELLO STUDIO DELLA DIVERSITÀ ANIMALE

❖ ***La caratterizzazione genetica tra genetica e scienza sociale.***

Secondo le statistiche ufficiali (FAO; Cardellino 2003) sono catalogate circa 6300 varietà/razze appartenenti alle diverse specie di mammiferi ed uccelli; di queste già 740 sono ufficialmente estinte mentre altre 1400 (il 32% circa) sono ad elevato rischio. E' stato stabilito a livello internazionale che per biodiversità animale s'intende la variabilità tra organismi di specie diverse o della stessa specie riguardo ai differenti ecosistemi e ambienti in cui essi vivono, con particolare riferimento alla biodiversità genetica che, essendo quella ereditabile di generazione in generazione, offre maggiori potenzialità di sopravvivenza per il futuro (Bouzat *et al.* 1998; Tilman 2000).

Principale fattore responsabile della perdita di "ricchezza genetica" è stato il grande aumento di tipi genetici molto selezionati e specializzati per determinate produzioni. In molti Paesi si è osservato il proliferare massiccio di poche razze allevate in condizioni ambientali controllate e tramite l'uso indiscriminato di tecniche selettive avanzate quali, per esempio, l'inseminazione artificiale. Questi sforzi selettivi, per lo più improntati al miglioramento quantitativo della produzione, hanno, nel corso degli anni, ridotto notevolmente la variabilità genetica animale.

Tendenza comune in molti Paesi industrializzati fu quella di sostituire le antiche razze locali, ben adattate a un determinato ambiente, ma poco produttive, con tipi genetici selezionati che, allevati con sistema intensivo, erano in grado di dare altissime produzioni in maniera costante così da essere più competitive in un mercato in fase di espansione. L'utilizzazione di poche razze molto produttive a scapito di tipi genetici più rustici ha determinato un grande disinteresse economico e culturale nei confronti delle popolazioni meno produttive ma che possono rappresentare un'importante fonte di biodiversità.

Esempio clamoroso è quello della razza Frisona in cui, nel 1990, circa il 50% dei circa 5000 tori presenti sul mercato internazionale delle dosi di seme, era figlio di soli 5 tori (Wickham & Banos 1998).

Molte volte ci si è interrogati sull'importanza della conservazione e quindi della caratterizzazione della biodiversità. In realtà gli argomenti riguardano diversi ambiti della società umana che vanno dalla ricerca molecolare pura agli studi di sostenibilità sociale (Delgado 2002; Perezgrovas 2003). In primo luogo la conservazione ha una forte importanza di ordine economico e sociale; infatti, il mantenimento della variabilità può garantire una forte flessibilità e variabilità delle produzioni in modo da venire incontro a differenti richieste del mercato creando così un sistema economico in grado di reagire più velocemente e naturalmente ai cambiamenti economici legati sia alla produzione sia alle esigenze del consumatore. In secondo luogo, le razze autoctone sono in grado di rispondere perfettamente alla tendenza mondiale a produrre meno, ma con miglior qualità, incarnando così letteralmente la famosa formula: minore quantità, maggiore qualità. Altra considerazione è che per molti paesi sottosviluppati queste sono l'unica possibilità produttiva in grado di dare risultati in assenza di mezzi tecnici adeguati garantendo un allevamento più economico (Cardellino 2002).

Dal punto di vista scientifico e biologico la conservazione della biodiversità offre una base più ampia su cui eseguire la selezione e ricercare caratteristiche produttive interessanti (QTLs o Quantitative Trait Loci), operazione che è assai difficile in caso di scarsa variabilità genetica che conduce in definitiva a minor quantità di varianti geniche. Scarsa variabilità genetica significa anche avere individui che hanno scarsa capacità di adattamento al mutare delle condizioni ambientali. C'è da dire, infatti, che tutte le specie hanno una durata limitata nel tempo perché l'estinzione è un processo naturale, fisiologico, cui tutti gli individui dovranno a un certo punto arrivare: questo processo però è accelerato notevolmente dall'uomo che, cercando di incrementare le produzioni, minaccia la biodiversità e rende sempre più povera la riserva di variabilità genetica presente nelle razze più rustiche. E' noto la ricerca genetica, che si è occupata durante gli anni sia dello studio dei geni sia della loro vera e propria

identificazione nel genoma, ha bisogno della conoscenza delle popolazioni animali e della loro struttura.

In ultima analisi la conservazione di razze e tipi genetici tradizionali riveste un'importanza culturale legata alla necessità di preservare la storia e le tradizioni di un popolo che interagisce con l'ambiente in cui vive.

❖ **La caratterizzazione e il concetto di razza**

Studiare la variabilità genetica, o comunque la struttura di un gruppo d'individui non può prescindere, almeno in parte, dal dare una divisione logica a ciò che si tenta di analizzare.

La diatriba riguardante la definizione (e il significato reale) di un gruppo di animali o individui continua ancora ai giorni nostri, soprattutto in ambito umano dove si scontrano interessi ben più ampi della semplice necessità di comprendere le dinamiche filogenetiche (Barbujani 2006).

Anche in ambito animale non è facile dare una definizione univoca di razza o varietà o popolazione, anzi, a volte è proprio sul termine che non si trova accordo e il problema deriva dal fatto che ogni ambito che consideriamo richiede una definizione precisa. Nella specie umana l'etichetta di razza ha più un valore di differenziazione sociale (Foster & Sharp 2002), in altre parole una persona è per noi italiano, francese, spagnolo perché mangia, veste in una determinata maniera o ha certe abitudini. Ma dal punto di vista genetico, almeno se si prendono in considerazione i popoli dell'Euro - Asia e del Nord Africa, parlare di razze non ha alcun senso, visto che le vicende storiche hanno fatto sì che facciamo parte di un'unica grande razza con molte differenze culturali ma ben poche a livello del DNA (Bamshad & Olson 2003; Bamshad *et al.* 2004), infatti diversi scienziati hanno provato con diverse tecniche l'inutilità delle classificazioni morfologiche nell'uomo, tanto che il noto genetista Cavalli Sforza, definì le razze come un "esercizio inutile" avendone dimostrato l'infondatezza genetica (Cavalli-Sforza & Bodmer 1971). Ma ancora oggi, parlare di razze è per alcuni di importanza primaria, tanto che in nome delle

differenze razziali è nata una vera e propria “scienza” delle differenze con chiari sfondi di intolleranza (Herrnstein & Murray 1996). Quando Albert Einstein arrivò negli USA e gli chiesero di che razza fosse, rispose: “Sono di razza umana!” e, in effetti, non aveva tutti i torti, soprattutto dal punto di vista molecolare.

Ma partiamo dall’inizio: la definizione di razza comunemente accettata in maniera generalista è quella che la definisce come “un gruppo di esseri viventi appartenenti ad una stessa specie e accomunati da caratteri comuni che si differenziano, in modo più o meno marcato, da altri gruppi di esseri viventi appartenenti alla stessa specie (Wikipedia; Mayr 1942)”, e fin qui sembrerebbe facile individuare in un gruppo di individui una razza, ma non è così. Abbiamo visto che nell’uomo la razza è più un fatto culturale biologico, e negli animali? E’ curioso vedere che, in biologia, si usa il termine razza per definire gli animali domestici (Wikipedia). Ecco allora che nella specie felina parliamo di leoni, linci e gatti selvatici se siamo nella savana o nei boschi dell’Appennino e curiosamente, di Persiano, Siamese, Pastore Tedesco, Pechinese e così via, se siamo sul divano di casa. Negli animali selvatici sembrerebbe più facile, quant’anche ci siano delle differenze all’interno della specie e della popolazione, definire i gruppi etnici in maniera inspiegabilmente diversa da quanto facciamo con i nostri animali domestici; abbiamo allora che il leone esiste della varietà Serengeti o Kenia, o ancora le diverse popolazioni di tigre (quella di Giava o quella della Birmania) sono definite sottospecie. Allora quando definiamo con il nome di Merino una razza ovina spagnola dalla lana fine e dalle forme tipiche di un animale da carne compiamo una classificazione diversa rispetto al naturalista che osserva i gruppi di mufloni del Gennargentu, definendoli sottospecie del gruppo dei bovidi selvatici? Secondo un rapido esame, il grado di classificazione che si compie su un gruppo di mufloni selvatici ascrivibili a una “razza”, ad esempio il muflone Sardo, dovrebbe essere simile a quello fatto su ogni altra razza domestica come il Merino o il Suffolk. Ciò è vero solo in parte, perché nella costituzione delle razze domestiche si sono susseguiti innumerevoli eventi d’incrocio e migrazioni di gruppi di animali per mano dell’uomo che non avvengono, se non di rado, nelle popolazioni naturali

(Quiroz 2007). Inoltre rispetto alle popolazioni naturali, le razze domestiche (come anche i gruppi etnici umani) sono di recente costituzione e perciò i meccanismi di deriva genetica hanno avuto relativamente poco tempo per creare una vera e propria differenziazione a livello genetico, cosa che avviene nei selvatici, dove gruppi isolati di una stessa specie divengono vere e proprie sottospecie (Bamshad *et al.* 2004). Per la stessa ragione dopo anni di studi attraverso i marcatori molecolari sulle razze domestiche, soprattutto ovine, ci si è resi conto che i metodi statistici tradizionali, come le semplici distanze genetiche, non erano sufficienti per capire la vera struttura di un gruppo di individui (Ruane 1999), ma servivano algoritmi che considerassero le differenze di ogni animale come un riserva di variabilità a se stante (Falush *et al.* 2003).

La necessità di definire una razza sta in definitiva alla base del lavoro di conservazione e caratterizzazione, in virtù del fatto che permette di individuare gruppi di animali che fanno parte di uno specifico ambiente. Scopo della caratterizzazione è quello di individuare le basi genetiche dell'adattabilità a differenti ambienti (Storz 2005), trovare il segno indiretto nel genoma della selezione naturale e artificiale. Capire nelle più piccole sfumature questa relazione tra la variabilità del genoma che interagisce con le influenze esterne, può portare a preziose informazioni sui geni che influenzano questo e altri caratteri (Luikart *et al.* 2003).

GLI STRUMENTI PER LA CARATTERIZZAZIONE GENETICA

❖ ***Dai marcatori fenotipici ai molecolari***

Comunemente si dividono individui appartenenti a specie diverse o alla stessa specie in base alle caratteristiche morfologiche, in altre parole, basandosi su un modello che riassume tutti i caratteri salienti della popolazione da classificare, si associano tutti gli individui simili a esso. In passato questo tipo di approccio è stato usato in molti studi di caratterizzazione di specie animali, soprattutto negli studi naturalistici, ma anche nella classificazione delle popolazioni umane (Barbujani 2006). E' chiaro che tutti gli italiani sono simili tra loro, o per lo meno sono più simili tra loro di quanto non lo siano con gli inglesi e questi due popoli, a loro volta, sono differenti entrambi da quello russo. Questo perché la diversità morfologica è direttamente influenzata dalla struttura geografica dell'ambiente in cui vive una popolazione. E' così che i popoli del nord Africa sono nettamente differenti dagli Europei, perché nettamente differente è il loro habitat (Bamshad *et al.* 2004) e questo accade anche negli animali, dai più piccoli come la lumaca dei Pirenei che conta gruppi di individui diversissimi a seconda della vallata in cui vivono (Ochman *et al.* 1983). Anche negli animali domestici, sotto l'influenza della selezione umana, si riscontra una forte impronta ambientale, dove nel caso delle nostre razze s'intende per ambiente anche le condizioni socio - economiche (Roosen *et al.* 2005; Gizaw *et al.* 2007). Per questo si deve considerare che la caratterizzazione secondo le caratteristiche morfologiche, non è sempre in grado di analizzare la vera struttura genetica di un gruppo di individui, per il semplice motivo che la conformazione e l'aspetto esteriore di un soggetto dipendono da infinite variabili ambientali e geografiche (Hintum 1994; Gizaw *et al.* 2007), dal comportamento (Petit *et al.* 2001) e dalle condizioni ambientali in senso stretto, come le tecniche di allevamento negli animali domestici o ancora la scala sociale e gerarchica (Foster & Sharp 2002). Risultati nettamente più interessanti e informativi si ottengono quando si uniscono più informazioni

riguardanti le razze, provenienti sia dall'indagine molecolare sia da altri campi d'indagine, come già dimostrato nella specie ovina da Gizaw *et al* (2007), in uno studio che comparava le misure biometriche a quelle ottenute dai marcatori genetici, o da i numerosi studi che hanno applicato le informazioni geografiche (G.I.S.) ai dati molecolari con diverse finalità, che vanno dallo studio dell'influenza dei mercati economici sull'erosione delle risorse genetiche (Roosen *et al.* 2005) all'indagine volta allo studio dei geni coinvolti nella resistenza alle malattie (Joost *et al.* 2007). Altri autori pur riconoscendo che l'avvento delle biotecnologie per lo studio della variabilità genetica e per il monitoraggio delle razze minacciate di estinzione abbia portato notevoli vantaggi in termini di efficacia, aggiungono che questi non dovrebbero prescindere dall'integrare informazioni di natura storica, economica e culturale (Talle *et al.* 2005).

Generalmente l'obiettivo primario della caratterizzazione genetica è quello di misurare il grado di variabilità intrinseco in una razza, in maniera comparata con le altre allevate nello stesso ambiente, che si esprime in maniera, più specifica con la determinazione del numero effettivo di popolazione, da effettuarsi con strumenti sensibili e riproducibili come i marcatori molecolari (FAO 2004a).

Diversi marcatori molecolari sono stati utilizzati per studiare le popolazioni sia umane sia animali e vegetali. La scelta del marcatore come vedremo è stata dettata negli anni, più dal costo necessario per il suo studio e dalla fattibilità pratica in laboratorio che dall'effettiva superiorità. Infatti, è noto da molti anni che quasi tutti i marcatori biochimici e molecolari portano alle stesse conclusioni circa la diversità genetica e la struttura delle popolazioni. Ciò che è cambiato nel corso delle nuove scoperte è la velocità e l'economicità dell'analisi; questo come conseguenza ha portato ad effettuare studi che utilizzano un numero sempre maggiore di marcatori migliorando in definitiva l'affidabilità statistica e la precisione degli studi, ma non il risultato generale dell'indagine (Lewontin 1972; Cavalli-Sforza *et al.* 1994; Barbujani 2006).

I primi marcatori erano di tipo biochimico e per lo studio della variabilità utilizzavano essenzialmente il polimorfismo fenotipico espresso da alcune

proteine antigeniche dei globuli rossi: il sistema AOB (Calafell *et al.* 2008). Il loro utilizzo sistematico nel settore dell'inferenza filogenetica, fu relegato per ragioni ovvie di costo e praticità, alla specie umana salvo essere poi rapidamente sostituito dalle nuove tecniche basate sui polimorfismi proteici e del DNA che avevano una maggiore informatività e semplicità di studio.

In seguito la ricerca si concentrò sullo studio del polimorfismo proteico ed enzimatico (Hunter & Market 1957). In questo caso i marcatori molecolari erano rappresentati dai cosiddetti alloenzimi, varianti alleliche di enzimi codificati da geni strutturali. Gli enzimi sono proteine costituite da aminoacidi, alcuni dei quali carichi elettricamente. Il risultato è che gli enzimi hanno una carica elettrica netta, dipendente dall'insieme degli aminoacidi costituenti la proteina. Quando a causa di una mutazione un aminoacido è sostituito con un altro, la carica netta della proteina può cambiare. Poiché i cambiamenti nella carica elettrica influenzano la velocità di migrazione delle proteine in un campo elettrico, la variazione allelica può essere determinata attraverso l'elettroforesi su gel e la successiva colorazione specifica per l'enzima oggetto di studio. Normalmente per ogni enzima possono essere distinti due o più loci, detti isoloci. Per questo motivo, la variazione alloenzimatica è anche detta isoenzimatica. Questi marcatori hanno lo svantaggio di essere poco abbondanti e di avere un basso livello di polimorfismo.

Questi tipi di marcatori misurano la variabilità genetica indiretta, infatti, le diverse conformazioni di aminoacidi di una stessa proteina da individuo a individuo sono il risultato di mutazioni a livello del locus codificante il polipeptide, anche se c'è da considerare che quasi tutte le proteine sintetizzate da un organismo, siano interessate poi da una maturazione che ne altera la struttura originaria.

In molti studi sono stati utilizzati per analizzare la struttura razziale e varietale in animali e piante. Ad esempio Tapio *et al.* (2003) ha studiato la diversità genetica nella specie ovina, comparando i dati ottenuti da alcuni loci microsatelliti e dall'analisi di alcuni polimorfismi proteici ottenendo risultati praticamente sovrapponibili, come del resto dimostrato da numerosissimi altri

autori (Lewontin 1972; Cavalli Sforza 1996). Anche questo tipo di marcatori fu ben presto rimpiazzato da quelli scoperti a livello genomico.

I marcatori molecolari di tipo genetico che permettono di rilevare questo polimorfismo direttamente lungo la sequenza polinucleotidica del DNA possono essere definiti come forme molecolari derivate da un gene espresso o da uno specifico frammento di DNA la cui sequenza può non essere conosciuta (Ferreira & Grattapaglia 1998). I marcatori molecolari ci consentono di rilevare la diversità dovuta a mutazioni di regioni di DNA omologhe in individui diversi appartenenti alla stessa o a differenti specie. Secondo Cavalli Sforza (1971) per polimorfismo di un marcatore molecolare si intende la presenza di uno o più alleli in un locus, cioè la presenza di sequenze diverse dello stesso gene o frammento di DNA situato su una coppia di cromosomi omologhi con la condizione che ognuno di questi alleli si presenti con una frequenza apprezzabile almeno dello 1%; inoltre, la variazione non deve essere mantenuta nella popolazione unicamente per mutazione (Ford 1965).

❖ **Tipi di Marcatori molecolari basati sul DNA.**

In base ai genotipi caratteristici che si ottengono dalla loro analisi, i marcatori molecolari si classificano in co - dominanti se l'eterozigote si distingue dai due omozigoti, quindi sono evidenziabili due o più alleli e in dominanti se i due alleli sono presenza e assenza del marcatore, quindi l'eterozigote, caratterizzato dalla presenza di una sola copia del marcatore, non si distingue dall'omozigote, caratterizzato dalla presenza di due copie.

In termini generali si cerca in un marcatore una serie di requisiti qualitativi:

1. deve essere polimorfico, in maniera tanto più accentuata, quanto più è grande la definizione che vogliamo;
2. il suo risultato dovrebbe essere libero da qualsiasi influenza da parte dell'ambiente e non presentare effetti pleiotropici o epistatici;

3. nel caso di studi di popolazione, deve essere neutro, ossia le sostituzioni alleliche a livello del locus non devono avere altri effetti sul fenotipo;
4. nell'insieme i marcatori devono essere reciprocamente indipendenti rispetto alla segregazione;
5. il genotipo deve essere di facile determinazione e riproducibile.

In realtà, per la scelta del marcatore da usare, si cerca anche, un compromesso tra la sua efficacia e l'applicabilità con i mezzi di cui si dispone. Una serie di norme reali che poi si utilizzano per la scelta, sono:

1. effettiva economicità della tecnica di analisi, anche valutando il numero di marcatori e il numero d'individui da genotipare;
2. applicabilità tecnica in laboratorio;
3. possibilità di riutilizzare le informazioni per successivi studi.

Si sono usati negli anni una grande varietà di marcatori molecolari su base genetica che possono essere facilmente raggruppati nei marcatori che non utilizzano la tecnica della PCR e quelli che invece vi fanno ricorso.

Quest'ultimo tipo può ancora essere diviso in marcatori basati sulla tecnica di PCR con amplificazione non specifica o Arbitrary – PCR – Priming e in marcatori che utilizzano l'amplificazione di siti noti o Targeted – PCR.

Marcatori non basati sull'uso della PCR

I più noti sono sicuramente i RFLPs o polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione. I RFLPs (Botstein *et al.* 1980) sono marcatori molecolari caratterizzati da dominanza, quindi per i quali il genotipo eterozigote è distinguibile da quello omozigote. Furono i primi marcatori molecolari ad essere utilizzati; il metodo di analisi consiste nella digestione del DNA con un enzima di restrizione seguita dalla separazione dei frammenti prodotti in base

alla loro dimensione tramite una corsa elettroforetica. I passi successivi sono il trasferimento dei segmenti di DNA su una membrana di nylon o nitrocellulosa, l'ibridizzazione con una sonda marcata con isotopi radioattivi o con fluorocromi, l'autoradiografia per il rilievo dei risultati (Southern Blotting). La sonda può essere complementare a un elevato numero di basi nucleotidiche e offrire la possibilità di rilevare polimorfismo senza nessuna preventiva informazione di sequenza. Importanti differenze sono evidenti quando la lunghezza dei frammenti è diversa e questo implica che l'enzima di restrizione digerisca il DNA in posizioni fra loro indipendenti. I RFLPs sono il risultato di una mutazione puntiforme che crea o elimina un sito di restrizione oppure di una delezione o inserzione che altera la dimensione di uno specifico frammento di restrizione. I polimorfismi sono evidenziati da bande diverse nella membrana che poi rappresenta fedelmente la situazione dopo la corsa elettroforetica: se, per esempio, un frammento ha perso un sito di restrizione, si avrà una banda elettroforetica anziché due, se un frammento ha acquisito per inserzione dei nucleotidi, otterrò una banda con peso molecolare maggiore e quindi più lenta nella migrazione.

I RFLPs presentano alcuni svantaggi: la tecnica per il loro rilevamento è molto elaborata e richiede molto tempo, è necessaria una quantità notevole di DNA di alta qualità. Di contro i RFLPs hanno il vantaggio di essere marcatori molecolari dominanti, molto stabili e riproducibili.

Un'evoluzione di questa tecnica sono i marcatori CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) che applicano la digestione del DNA ad una specifica sequenza, previamente amplificata per PCR, ma sono molto poco utili per lo studio di popolazione e sono per lo più usati per la tipizzazione di specifiche regioni di interesse (Di Stasio & Rolando 2005; Crisà *et al.* 2003).

Marcatori basati sull'uso della PCR non specifica.

L'avvento della PCR (Mullis *et al.* 1986) o meglio la sua utilizzazione pratica nella genetica molecolare applicata, permise l'avvento di numerose tecniche per lo studio del DNA di grande efficacia. Questo primo tipo di marcatori che non si basavano sull'amplificazione di una sequenza specifica furono i primi a essere utilizzati. Il vantaggio più grande era che potevano essere utilizzati in qualsiasi specie, e ciò ne fa ancora oggi, un ottimo strumento di indagine dove non esistano ancora informazioni precise sul genoma di un animale (Sønstebo *et al.* 2007).

I primi a essere applicati furono i RAPDs (DNA polimorfico amplificato casualmente).

Sono marcatori molecolari multiallelici, multilocus, caratterizzati da dominanza.

I RAPDs consistono in un'amplificazione del DNA modificata (Williams *et al.* 1990). L'amplificazione si esegue con un solo primer di sequenza abbastanza corta (generalmente 10-12 paia di basi) invece di due, di sequenza aleatoria. Il primer si appaierà su posizioni casuali lungo la catena di DNA. Questa tecnica quindi differisce dalla classica PCR, poiché l'amplificazione del DNA non è più mirata a sequenze predeterminate, bensì casuale.

E' sicuramente un metodo molto pratico per la facilità di attuazione della tecnica e per la grande quantità di frammenti di DNA ottenuti che permettono la separazione su gel d'agarosio e visualizzazione tramite luce ultravioletta e Bromuro di Etidio. Inoltre, non è necessaria alcuna informazione preliminare sulla sequenza da amplificare.

Questi marcatori molecolari sono dominanti quindi forniscono un più basso livello d'informazione; oltretutto, essi sono molto sensibili alle condizioni di reazione rispetto ad altri marcatori e questo si ripercuote essenzialmente sulla riproducibilità dei risultati che si rivela abbastanza ridotta. Sono stati usati in moltissimi lavori per lo studio del genoma animale, proprio per la loro versatilità (Spritze *et al.* 2003; Alves *et al.* 2005).

L'acronimo AFLP significa Polimorfismo della Lunghezza dei Frammenti Amplificati (Amplified Fragment Length Polymorphism). Sono marcatori molecolari dominanti, quindi il genotipo eterozigote non si distingue da quello omozigote.

Nel 1992 fu introdotta una tecnica innovativa che fondeva quella dei RFLP e i RAPD, chiamata Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). L'analisi tramite AFLPs consiste in cinque fasi successive: 1) digestione del DNA genomico con due enzimi di restrizione specifici per un determinato sito. Sono utilizzati un enzima di restrizione "frequente" e uno "raro" (nel genoma specifici siti di restrizione possono comparire molto frequentemente o molto raramente). Dopo la digestione sono generati tre tipi di frammenti con estremità caratteristiche; 2) la ligazione di specifici adattatori per i siti di restrizione ai terminali dei frammenti di restrizione generati; 3) pre - amplificazione selettiva con primer omologhi e complementari alle sequenze di taglio e alle sequenze degli adattatori che presentano però un nucleotide selettivo in 3' che l'operatore può scegliere fra i quattro possibili. Così facendo saranno amplificate solo quelle sequenze che iniziano con il nucleotide caratterizzato dalla base complementare a quella scelta, per cui si riduce il numero dei frammenti amplificati; 4) amplificazione selettiva mediante primer complementari di nuovo all'adattatore e alle sequenze di taglio. Questa volta i primer contengono più nucleotidi selettivi in 3' (generalmente tre), chiaramente scelti dall'operatore, il primo del quale però deve coincidere obbligatoriamente con quello usato in precedenza nella pre - amplificazione. È opportuno ricordare che uno dei primer deve essere marcato. Alla fine sarà amplificato l'1/4096 dei frammenti iniziali; 5) separazione dei prodotti di amplificazione in gel di poliacrilammide e lettura.

Utilizzando combinazioni di nucleotidi selettivi diversi si può ottenere un numero di marcatori molto elevato da un solo processo di digestione e ligazione. Il polimorfismo è determinato dalla presenza di mutazioni, delezioni e inserzioni che cambiano la sequenza di restrizione.

Anche gli AFLP sono stati molto usati perché non richiedono informazioni preliminari sulla sequenza genomica della specie in analisi, e questo è un

vantaggio soprattutto in zootecnia, dove gli investimenti nel sequenziamento dei genomi non sono elevati come nella genetica umana. Per questo numerosissimi sono stati gli studi di biodiversità e filogenia in numerose specie domestiche con questo tipo di marcatore, quali quella suina (SanCristobal *et al.* 2006), bovina (Ajmone-Marsan *et al.* 2002; Buntjer *et al.* 2002; Negrini *et al.* 2006) e caprina (Ajmone-Marsan *et al.* 2001).

Marcatori basati sull'uso della PCR specifica.

L'approccio basilare delle tecniche che utilizzano sequenze specifiche è il disegno di una coppia più o meno specifica di primer. Richiedono conoscenze del genoma in studio abbastanza elevate, ma possono essere facilmente automatizzate, soprattutto nella fase di acquisizione del risultato che può avvenire per semplice confronto su gel di agarosio o formaldeide o in strumenti più raffinati come apparati di elettroforesi in gradiente di temperatura o in sequenziatore automatici.

Le prime di queste tecniche furono la TGGE (Thermal Gradient gel electrophoresis), la DGGE (Denaturign Gradient Gel electrophoresis) e le usatissime SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e la HFP (Heteroduplex Formation Polymorphism). Sono state usate soprattutto per determinare il polimorfismo presente in specifiche sequenze amplificate, senza determinare direttamente il tipo. Infatti, il principio di analisi si basa essenzialmente sulle diverse conformazioni che filamenti di DNA di eguale lunghezza, possono assumere in virtù della diversa composizione in nucleotidi e quindi anche delle mutazioni. Anche se ci sono stati esempi di automazione, come nel caso della DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography), queste tecniche sono state ben presto sostituite, dall'avvento dei *chip* a DNA con i quali è possibile ottenere il genotipo di migliaia di SNPs a costi bassissimi.

I marcatori più usati in questo momento, sono senza dubbio gli SNPs o Polimorfismo di Singoli Nucleotidi.

Sono marcatori molecolari codominanti, in cui il genotipo eterozigote si distingue da quello omozigote.

La differenza genetica minima tra due genotipi a un determinato locus è rappresentata dalla differenza per un nucleotide singolo.

Gli SNPs sono marcatori molecolari che sfruttano la presenza di mutazioni puntiformi nel genoma; sono variazioni della sequenza di DNA che si manifestano quando nella sequenza genomica è alterato un singolo nucleotide. È stato calcolato che nel genoma umano esista una di queste mutazioni ogni 100-300 paia di basi (Cooper *et al* 1985).

Gli SNPs sono definiti da Brookes (1999) come regioni rappresentate da singole paia di basi nel DNA genomico alle quali esistono sequenze alternative (alleli), tali che in alcune popolazioni l'allele meno frequente ha una frequenza uguale o maggiore dell'1%. Per questo motivo semplici delezioni o inserzioni mononucleotidiche non sono considerate formalmente SNPs.

Molti SNPs sono caratterizzati dalla sostituzione della citosina con la timina.

La tecnica di analisi si esegue tramite sequenziamento del frammento di DNA, tramite l'utilizzo di As-PCR (Allele Specific PCR) o tramite *Biochips*.

Gli SNPs sono diventati importanti marcatori molecolari poiché dotati di grande stabilità intrinseca: infatti, essi hanno un tasso di mutazione molto basso. Inoltre, essi possono essere amplificati durante i test tramite PCR e questo va a semplificare tutto il processo.

Gli SNPs sono spesso contenuti nei geni espressi e questo è utilissimo nello studio di malattie genetiche perché si può spiegare un fenotipo alternativo alla media della popolazione con un eventuale polimorfismo della sequenza, ad esempio, è stato provato che determinati SNPs possano influenzare un organismo nei confronti della risposta fisiologica all'assunzione di droghe (Schubbert, 2001).

Questi marcatori molecolari hanno il vantaggio sostanziale di essere uniformemente dispersi in tutto il genoma (ma di essere poco polimorfici); sono molto riproducibili e molto informativi. La loro utilizzazione, inoltre, non presenta difficoltà sostanziali, ma anzi, il processo metodologico può essere automatizzato.

Tuttavia gli SNPs richiedono costi elevati per la loro analisi, anche se in verità, ora le tecnologie legate all'impiego di questi marcatori sono in rapida evoluzione. Essi richiedono la conoscenza preventiva d'informazioni di sequenza. Sarà di fondamentale importanza per gli SNPs lo sviluppo di software sempre più potenti che rendano più efficienti il loro utilizzo e la loro analisi. L'interesse principale per questi marcatori non risiede nell'utilizzo per lo studio della variabilità genetica o per la ricerca di QTL, perché i microsatelliti molto più polimorfici, sono molto più informativi e adatti per questi studi. È nel campo dei polimorfismi genici applicati alla selezione assistita da marcatori che si attendono i maggiori risultati. Sono, infatti, stati fatti moltissimi studi, per determinare l'effetto di questi polimorfismi sulle espressioni dei geni coinvolti nelle produzioni d'interesse zootecnico e ultimamente si sta studiando in diversi paesi la loro applicazione negli schemi di selezione o in programmi di ricerca di geni candidati (Pariset *et al.* 2006; DeVuyst *et al.* 2008).

Gli ultimi due tipi di marcatori basati sulla reazione di PCR specifica sono i Microsatelliti che saranno trattati nel paragrafo successivo e il sequenziamento dei prodotti di PCR per quanto riguarda le regioni polimorfiche del DNA mitocondriale che sarà trattato nel capitolo ad esso dedicato.

MARCATORI MICROSATELLITI

❖ **Generalità**

I microsatelliti sono definiti anche *Short Tandem Repeat* (Edwards *et al.* 1991), *Simple Sequence Repeat* (Jacob *et al.* 1991) o *Sequence Tag Microsatellite Sites* (STMS). Sono costituiti da quella parte del DNA denominato extragenico che rappresenta circa il 70% dell'intero genoma dei mammiferi superiori. Di questa parte circa il 20 % è rappresentata dagli elementi di DNA ripetuto tra i quali oltre ai microsatelliti si ritrova un'ampia famiglia di marcatori e regioni genomiche, come satelliti, minisatelliti, LTR (Long terminal repeat) ecc (Strachan & Read 1996).

I microsatelliti sono sequenze semplici ripetute tra le dieci e le trenta volte e la sequenza ripetuta può essere composta di una a sei paia di basi con la conseguente formazione di sequenze di microsatelliti dinucleotidiche, trinucleotidiche, tetranucleotidiche, ecc.

I microsatelliti sono interdispersi nei genomi eucariotici, soprattutto a livello delle regioni non codificanti (Tautz & Renz 1984). La loro distribuzione è intercalare in tutto il genoma eucariota, approssimativamente ogni 10.000 paia di basi in tutti gli eucarioti. È opportuno ricordare che è proprio la dimensione della sequenza ripetuta e il numero di ripetizioni che differenziano principalmente i microsatelliti dai minisatelliti che sono quindi più grandi e maggiormente ripetuti (Jeffreys *et al.* 1985).

Sono definiti in base al tipo di ripetizione e quindi sono di - nucleotidici quando l'unità base è costituita dalla ripetizione di 2 nucleotidi e così via, fino ad arrivare a 6 paia di basi (Schlotterer 2000). In base al tipo di ripetizione si possono classificare in tre famiglie: la prima comprende i microsatelliti definiti puri la cui sequenza è costituita dalla semplice ripetizione per n volte della sequenza base. La seconda famiglia comprende i microsatelliti composti di due tipi di sequenze ripetute n volte e alternate, mentre la terza rappresenta microsatelliti che hanno all'interno della loro sequenza una o più interruzioni

prodotte da 7 - 8 paia di basi casuali o da singoli nucleotidi mutati (inserzioni o delezioni) e sono definiti per questo imperfetti, in quanto, in molti casi queste interruzioni provocano il blocco dell'evoluzione del microsatellite quando avvengono nell'estremità 3' della sequenza del marcatore (Sturzeneker *et al.* 1998) o sono semplicemente mantenuti nella sequenza del marcatore provocando anomalie nel numero di ripetizioni (Meadows *et al.* 2004). I più utilizzati per le analisi di diversità e variabilità genetica sono i microsatelliti puri con due, tre o quattro ripetizioni perché gli altri oltre ad essere meno frequenti nel genoma si presentano meno polimorfici e di più difficile studio.

Le ripetizioni possono essere composte di differenti nucleotidi e la loro distinzione può essere operata sulla base della frequenza con cui s'incontrano nel genoma, che è molto superiore per i microsatelliti di - nucleotidici, e sulla base della loro stabilità.

La sequenza di tipo $(CA)_n$ è la più rappresentata nel genoma e di conseguenza la più studiata, al contrario la sequenza $(GC)_n$ è scarsamente rappresentata, se non completamente assente, a causa del fenomeno che porta alla mutazione della sequenza: la citosina è molto suscettibile alla metilazione che la converte in timina, formando così la sequenza $(GT)_n$.

Negli ultimi anni sono state formulate più ipotesi riguardo la loro origine e funzione e per molto tempo sono stati considerati come DNA - spazzatura in virtù dell'ipotesi che li vede come frutto di errori della DNA polimerasi in fase di replicazione, che rimangono inglobati nel genoma perché del tutto neutri dal punto di vista funzionale (Brown 1999). Secondo altri autori svolgerebbero un importante ruolo nel mantenimento della struttura dei cromosomi, principalmente per la capacità che possiedono alcune sequenze del tipo $(CA)_n$ di mantenere la conformazione Z del DNA (Nordheim & Rich 1983) e, anche se la funzione di questo DNA non è completamente conosciuta, si crede che questo possa facilitare "l'impacchettamento" della doppia elica durante la condensazione cromosomica nella meiosi (Gross & Garrad 1986), ipotesi che sarebbe dimostrata dall'abbondanza di questo tipo di DNA nei telomeri e nei centromeri (Brown 1999). Una terza teoria vede i microsatelliti come un adattamento evolutivo dei genomi degli organismi superiori per dare al DNA

una sorta di spaziatura funzionale che garantisce il corretto funzionamento dell'espressione genica, in fase di trascrizione aumentando la velocità del processo (Hamada *et al.* 1984), altri invece ritengono che rappresentino una fonte necessaria di variabilità nel genoma eucariotico.

Gli ultimi studi sui microsatelliti hanno apportato però nuova luce sulla funzione di questi marcatori. Le nuove ipotesi sono sorte quando da alcuni anni si sono ritrovati dei microsatelliti in regioni codificanti (Toth *et al.* 2000; Sreenu *et al.* 2006; Sreenu *et al.* 2007), ad esempio, negli introni dei geni. Infatti, si è studiato nella nostra specie il comportamento di alcuni di questi marcatori che avrebbero una diretta associazione tra il numero di ripetizioni o i diversi polimorfismi e il frame di lettura dell'informazione genica, provocando una traduzione completamente differente da quella attesa o in altri casi malattie genetiche anche gravi, confermando che i microsatelliti abbiano anche ruoli funzionali nel genoma (Li *et al.* 2004; Martin *et al.* 2005; Sreenu *et al.* 2006).

I microsatelliti sono stati utilizzati in maniera massiccia per lo studio del genoma animale. Inizialmente furono impiegati per mappare i genomi in differenti specie (Maddox *et al.* 2001; Antoniou *et al.* 2002) e soprattutto per le analisi di parentela ed esclusione, per le quali sono i marcatori ancora più utilizzati (Glowatzki-Mullis *et al.* 2007). Nella Specie ovina sono stati usati per il calcolo delle distanze genetiche in razze ovine Merino (Diez-Tascón *et al.* 2000) ma anche in studi di somiglianza genetica tra razze europee (Grigaliunaite *et al.* 2003; Alvarez *et al.* 2004; Peter *et al.* 2005a; Lawson Handley *et al.* 2007) o per testare la struttura di popolazione di razze autoctone (Joost *et al.* 2007) e per lo studio della distribuzione di geni candidati (Schlotterer & Tautz 1992).

❖ **Meccanismo di evoluzione e di Mutazione**

Come già detto il numero di ripetizioni che sono alla base del polimorfismo di questi marcatori molecolari, sono l'unità fondamentale del microsatellite e sarebbero dovute al fenomeno di *replication slippage*: questo fenomeno non è altro che lo scivolamento dell'enzima DNA Polimerasi durante la replicazione del DNA che sarebbe causa della formazione di anse di DNA non appaiato (Ellegren 2004). Dopo che la replicazione di una sequenza ripetuta è iniziata, i due filamenti di DNA (quello stampo e quello nascente) possono dissociarsi a causa dello scivolamento della Polimerasi; se il filamento nascente si riassocia non rispettando il corretto allineamento di sequenza, la replicazione, continuando, porterà alla formazione di un filamento con diversa lunghezza rispetto al filamento stampo. Il riallineamento non corretto introduce, in questo modo, un *loop* (bolla) nel filamento nascente il risultato finale sarà un incremento della lunghezza della sequenza ripetuta. Il *loop* può formarsi nel filamento stampo dopo per la diversa lunghezza del filamento nascente (Strand *et al.* 1993). La maggior parte di queste mutazioni primarie è corretta dal *Mismatch-Repair-System* e solo una piccola frazione non riparata, si manifesta alla fine come un evento di mutazione microsatellitare (Ellegren 2004).

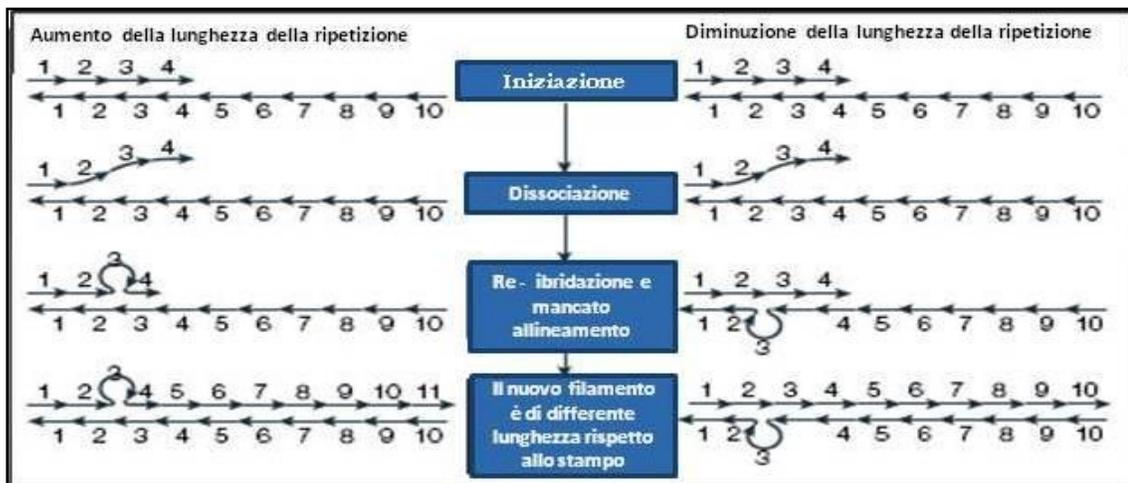


Figura 28: meccanismo di evoluzione della sequenza del microsatellite (modificato con il permesso di Ellegren, 2004©).

Per un marcatore neutrale i fattori basilari per la stima di diversi fattori legati allo studio di popolazione sono il polimorfismo, inteso come numero di alleli o differenti frequenze alleliche nella popolazione e il tasso di mutazione che ne è la causa diretta. Tuttavia i microsatelliti, pur essendo stati usati per più di 20 anni come il marcatore principe per l'inferenza evolutiva nella razze domestiche, sembrerebbero seguire, come tutto il genoma, regole ben più complicate di evoluzione rispetto a ciò che si pensava (Dallas 1992).

Il tasso di mutazione dei marcatori microsatelliti, di gran lunga maggiore al resto del genoma ($\approx 10^{-9}$) è varia da specie a specie e si situa intorno al valore di $9 \cdot 10^{-6}$ (*Drosophila Melanogaster*) a 10^{-2} (*Egernia stokesii*) ad ogni generazione (Ellegren 2000) e la sua variabilità non ha al momento alcuna spiegazione scientifica (Kimura & Crow 1964; Kimura & Ohta 1978; Ellegren 2004). Nelle specie di interesse zootecnico si situa intorno al $10^{-3} / 10^{-4}$. Questo parametro è comunque molto correlato alla lunghezza dell'unità ripetitiva, aumentando all'aumentare della lunghezza di quest'ultima, fatto spiegabile probabilmente con l'aumentare dei fenomeni di *slippage*.

Modello statistico di mutazione

Abbiamo visto che alla base del processo di mutazione del microsatellite c'è un ben preciso processo biochimico che avviene nelle reazioni che si svolgono in vivo a carico del DNA. Da questa semplice assunzione nasce però un problema che ha impegnato gli statistici per molti decenni. Se è vero che la DNA polimerasi può incorrere in errori nella sintesi del filamento, è vero anche che non si è in grado di sapere con certezza la natura di questo errore; in altre parole, se le ripetizioni aggiunte siano state una, due o addirittura ci sia stata una delezione.

Per poter quindi dare delle basi teoriche all'inferenza basata sui dati ottenuti da questi marcatori, è stato necessario postulare un modello statistico di

mutazione. Il più utilizzato è il modello detto SMM (*StepWise Mutation Model*) che presuppone che la DNA polimerasi sia in grado di produrre delle mutazioni - errori alla velocità di una unità ripetitiva, sia aggiungendola che eliminandola (Beckmann & Weber 1992; Ellegren 2004). Per spiegare casi più complessi del processo di mutazione si è poi introdotta la variante al modello che implicava l'aggiunta o l'eliminazione d'interi gruppi di ripetizioni creando una distribuzione a campana degli alleli (Kimura & Crow 1964).

Completamente diverso è il modello proposto da Kimura e Crow (Kimura & Crow 1964) detto IAM (*Infinite Allele Model*) che ipotizza invece la possibilità che si ottenga dal processo di mutazione, un qualsiasi allele non necessariamente correlato a quello di origine (Shinde *et al.* 2003).

Quest'ultimo modello sembra risolvere alcuni problemi derivanti dallo SSM che non tiene conto che i microsatelliti in natura hanno un limite di espansione quando avviene una mutazione che è stato stimato essere di 8 paia di basi (Lai & Sun 2003). In generale si è osservato che la grandezza dell'elemento ripetuto sia ancora una volta importante nel caratterizzare la somiglianza ad uno o l'altro modello (Xu *et al.* 2000). Alcuni autori hanno osservato in esperimenti in vitro o con l'uso di pedigree noti, che microsatelliti minori di 18 bp tenderebbero ad aumentare, mentre quelli più lunghi di questo numero tendono a diminuire la loro lunghezza (Kruglyak *et al.* 1998; Ellegren 2004). Un'altra complicazione all'adattabilità di uno o l'altro modello è la presenza di SNPs all'interno della sequenza del microsatellite che interrompe l'evoluzione dello stesso o in molti casi, tendono a causare la diminuzione della lunghezza dello stesso, complicando la formulazione di un'ipotesi precisa (Whittaker *et al.* 2003).

Ultimamente sono stati utilizzati altri metodi basati sulla massima verosimiglianza che risultano tuttavia più complessi nello studio (Crown & Kimura 1970). Un ultimo modello non citato di frequente è il KAM (*K-Allele Model*) che deriva dalla procedura di calcolo utilizzata nello studio del modello IAM (Di Rienzo *et al.* 1994). Secondo il KAM esistono K alleli che possono mutare sotto qualsiasi condizione a un altro allele, K-1. In virtù di quest'assunzione, quando K è infinito, il modello corrisponde allo IAM.

Considerando una semplice assunzione teorica sembrerebbe da alcune verifiche sperimentali, che microsatelliti con ripetizioni di 3 o 5 pb si evolvono secondo un modello SMM, mentre quelli con unità di ripetizione più corte (1 o 2 bp) seguirebbero un modello TPM (*Two Phase Model*) che è una semplice variante dello SMM che ammette però che ci siano mutazioni più lunghe di una singola ripetizione (Estoup *et al.* 1995; Balloux & Goudet 2002; Ellegren 2004). In conclusione il modello IAM rimane comunque il metodo più accreditato perché riesce a spiegare oltre ai normali fenomeni di mutazione, propri del microsatellite, come il *replication slippage*, anche quelle mutazioni che alterano il normale processo di evoluzione del marcatore (Chamberlain *et al.* 1990)

❖ **La tecnica di studio dei microsatelliti.**

Reazione a catena della Polimerasi e “multiplexing”

Come già detto questi marcatori sono basati sulla tecnica di amplificazione del DNA tramite la reazione di PCR. La tecnica in breve consiste nel duplicare in migliaia di copie un segmento del DNA che vogliamo analizzare. Questo permette di avere un gran numero di sequenze oligonucleotidiche che consistono nel frammento target di DNA circoscritto dai primer. Nel caso dei microsatelliti ciò che interessa è la lunghezza effettiva del frammento amplificato (lunghezza del primer + lunghezza delle ripetizioni) che può essere visualizzato con differenti tecniche.

La reazione di PCR consiste in generale in un buffer di reazione (sali vari e sostanze stabilizzanti il pH) nel quale sono aggiunti i primer, il DNA stampo e la Taq DNA polimerasi che catalizza l'intero processo che è sotto azione della temperatura tramite un apparecchio in grado di eseguire cicli di temperatura continui e programmabili (Termociclatore o “PCR” per antonomasia).

Da sempre i microsatelliti sono stati utilizzati in esperimenti che comprendessero un grande numero di marcatori, come quelli di mappaggio dei genomi o più recentemente di studio della variabilità genetica. Nel primo caso si utilizzano non meno di 50 marcatori per cromosoma, mentre per studi di popolazione, come sarà trattato più avanti, non scendiamo mai al di sotto di 15 - 25 marcatori per soggetto. E' logico che tale numero di sequenze da studiare abbia ridotto nei primi tempi la portata degli esperimenti per questioni soprattutto monetarie, perché era assai oneroso amplificare numerosi marcatori, ma soprattutto per l'impossibilità di visualizzare i risultati in tempi e costi ragionevoli.

Al problema del numero di reazioni si trovò la soluzione delle PCR multiplex, ossia reazioni di PCR con sequenze "target" multiple.

Mediante la PCR Multiplex si riescono ad amplificare contemporaneamente molte sequenze in una sola reazione, il che comporta risparmio di tempo, di lavoro ed una diminuzione dei costi (Ellegren *et al.* 1992; Baumung *et al.* 2006). E' importante sottolineare che, pur essendo molto comune l'uso di PCR Multiplex per amplificare sequenze ripetitive quali i microsatelliti (Mullis 1992), l'amplificazione di queste sequenze incontra più difficoltà rispetto a quella di sequenze non ripetitive. Teoricamente la PCR multiplex dovrebbe avere la stessa efficienza e specificità di una PCR normale, ma come vedremo questo non avviene mai per diverse ragioni di tipo biochimico e termodinamico (Chamberlain & Chamberlain 1994).

Il primo dei parametri che deve essere tenuto in considerazione è il disegno e la scelta dei primer per l'amplificazione.

In generale si dovrebbero scegliere oligonucleotidi che abbiano le stesse condizioni di reazione, che si traduce in definitiva nella stessa composizione in nucleotidi, ad esempio quello della coppia G + C; infatti, se il contenuto in C + G è troppo elevato (l'ottimo è intorno al 35%-60%) si possono avere appaiamenti aspecifici; se è troppo bassa causa appaiamenti inefficienti. Inoltre, la base terminale in 3' del primer deve essere C o G: questo stabilizza l'appaiamento in virtù dei tre legami a idrogeno che si instaurano fra la coppia CG contro i due della coppia AT (Gelfand 1989).

Riguardo alla concentrazione dei primer non esiste, sembrerebbe, una regola precisa, ma solo considerazioni empiriche. Per reazioni nuove e mai provate si consiglia in tutti gli studi di ottimizzazione di procedere con concentrazioni eque - molarità di tutti i oligonucleotidi: la concentrazione ottimale sarebbe intorno allo 0,4 μM per ognuno ma questo dato va poi aggiustato per ogni coppia di primer in base all'efficienza nella reazione multipla. In generale si usa aumentare la quantità di quella coppia di primer che amplifica in maniera non soddisfacente (in base al metodo di visualizzazione del risultato), fino a un massimo di 0,6 μM per ciascuno (12 μM totale).

Il passo di una reazione di PCR multiplex dove più si può intervenire per l'ottimizzazione è la composizione del buffer di PCR, in altre parole il miscuglio (esclusa la DNA polimerasi e i primer) che contiene tutti i reagenti necessari al processo di amplificazione, che può essere utilizzato nella reazione a una concentrazione finale che oscilla dallo 0,4 X al 3 X.

La composizione di un Buffer PCR 10X (concentrazione standard) consiste in diversi sali in soluzione:

- 500mM KCL che facilita l'ibridazione dei primer e il rendimento della DNA Polimerasi (Hoelzel & Bancroft 1992);
- 100mM Tris HCL pH 8 come il mezzo di reazione stabile in pH (Wan & Wilkins 1993) ;
- MgCl_2 tra 0,5 a 10 mM in base alla concentrazione dei dNTPs e dalla qualità dei primer;
- gelatina o Albumina di siero bovino 100 μg allo scopo di stabilizzare la reazione (Bachmann et al. 1990);
- glicerolo, SDS o Twen20 intorno al 0,1% per aumentare la resa e facilitare la reazione (Henegariu et al. 1997);
- dNTPs 50-200 μM di ognuno;
- DMSO al 2-10% per aumentare la specificità della reazione.
- Su questa miscela base possiamo intervenire in diverse maniere per facilitare una reazione multiplex.

Fondamentale è la concentrazione di $MgCl_2$, o meglio il suo rapporto con la concentrazione dei dNTPs. Infatti, questi ultimi captano ioni Mg^{++} durante la reazione e per questo che a concentrazioni elevate di dNTPs si deve aumentare la concentrazione del $MgCl_2$: il giusto rapporto è di solito $200\mu M$ di ogni dNTP e 3 mM di $MgCl_2$. Una diminuzione di ioni magnesio nel medio di reazione riduce drasticamente il rendimento ma ne aumenta la specificità (Henegariu *et al.* 1997). Anche la concentrazione dei detergenti a reazione basica come il Twen20 può aiutare la buona riuscita della reazione diminuendo la tensione statica del medio di reazione, ma il loro uso avanzato richiede una messa a punto accurata.

Alcuni autori (Innis *et al.* 1988) hanno osservato che per reazioni multiplex con prodotti di PCR di grosse dimensioni può essere di aiuto usare il buffer di PCR a concentrazioni finali più basse (0,5 – 0,8X), mentre può essere usato a concentrazioni più alte (fino a 2X) per prodotti di amplificazione piccoli, fenomeno che si spiegherebbe con una migliore denaturazione dei filamenti.

Non si sono viste differenze degne di nota nell'aumento di concentrazione dell'enzima TAQ sopra le 1 – 1,2 unità per reazione, anzi, ciò può comportare effetti negativi per il progressivo aumento del glicerolo (diluente usato per lo stoccaggio dell'enzima) nella reazione che può inibire il processo di replicazione.

Riguardo al DNA stampo, sono state definite numerose tecniche di estrazione allo scopo di utilizzare il materiale genetico per analisi microsatellitari. Senza dilungarci molto diremo che la reazione di PCR dei microsatelliti richiede di norma DNA di media qualità e, infatti, nelle analisi di routine si è soliti procedere a una semplice lisi del materiale biologico di partenza e al successivo utilizzo, ma sono necessari comunque alcuni accorgimenti:

- eliminazione di ioni e sostanze inibenti (emoglobina, cheratina, lanolina, metalli, ecc);
- stabilizzazione del pH (intorno a pH 8);
- eventuale concentrazione del DNA per avere una giusta diluizione;
- eliminazione o inattivazione di enzimi dannosi (proteinasasi, RNAasi).

La quantità di stampo adeguata per una reazione multiplex è di 50 – 100 ng per reazione, secondo la qualità.

Il parametro più importante, non solo in una reazione multiplex ma anche in una PCR semplice, è la temperatura, o per meglio dire le diverse temperature o fasi, nei cicli della reazione:

Prima fase: denaturazione iniziale

La fase iniziale di denaturazione, durante la quale la miscela è sottoposta a una temperatura di 92- 95 °C permette la totale inattività dell'enzima TAQ e la completa rottura del legame idrogeno che lega le due eliche di DNA. In questa fase si può intervenire soprattutto evitando l'inizio di amplificazioni secondarie che possono avvenire ad esempio durante le fasi di preparazione della miscela, a causa del riscaldamento della stessa. Per evitare ciò si possono usare diversi accorgimenti quali TAQ speciali, che devono essere attivate da un periodo di 5-10 minuti a 95° C o tramite il metodo Hot – Start, che consiste nell'aggiunta direttamente in piastra, di uno dei componenti della reazione solo dopo che il resto della miscela è stato sottoposto alla temperatura di denaturazione. Per tale tecnica sono utilizzate sostanze oleose (olio minerale o cere), che poste sopra il livello della reazione, ne prevengono l'evaporazione durante la fase di aggiunta del componente mancante che di norma è una miscela dei primer e acqua. È un accorgimento essenziale per le reazioni multiplex, poiché la presenza di molte coppie di primer può facilitare la formazione di dimeri stabili e la conseguente formazione di amplificati aspecifici.

Seconda fase: cicli di denaturazione – appaiamento - estensione

- *denaturazione*: quando i due filamenti di DNA si separano sotto effetto della temperatura (94°C per generalmente 30 secondi);
- *annealing o appaiamento*: appaiamento dei primer con il DNA a 50 - 72°C circa; generalmente dura 30 secondi

- *allungamento o estensione*: sintesi di DNA; avviene a 72°C, temperatura ottimale alla quale lavora la Taq Polimerasi; la durata ideale di questa fase dipende dalla dimensione della sequenza da amplificare (1 minuto per un Kbp).

Questa fase è essenziale ed è la vera e propria reazione. In questo periodo si può intervenire in diversi modi:

- ottimizzando la temperatura di appaiamento dei primer e scegliendoli possibilmente con temperature di fusione simili. Infatti, se le temperature di appaiamento sono molto diverse (55° vs 65° C) si rischia che siano amplificate più efficacemente solo alcune coppie a scapito di quelle con temperature più lontane da quella impostata. In generale, si è osservato che nelle reazioni con più coppie di primer è utile abbassare di 4 o 5 gradi la temperatura totale di appaiamento per migliorare la resa dei target più difficili, anche se è possibile la comparsa di amplificazioni aspecifiche. La durata di questo passo non sembra essere un parametro significativamente influente: di norma 45 – 60 secondi sono sufficienti, ma è utile prolungarla fino a 1,5 – 2 minuti quando alcuni primer hanno temperature molto basse di appaiamento;
- ottimizzando la temperatura di estensione. E' di norma impostata sui 70° - 72° C, ma può essere utile abbassarla fino a 65° C. Soprattutto in reazioni non efficienti si può ottenere una maggiore resa dei prodotti più piccoli. E' necessario 1 minuto per kb di sequenza target, ma si può omettere l'intero passaggio nel caso di sequenze molto corte in quanto la DNA polimerasi conserva dal 50% al 75% della sua attività a partire dai 55° centigradi (Beale 1998);
- regolando il numero di cicli. Il numero di cicli di norma sufficiente per avere una resa ragionevole di prodotto amplificato è di 25 – 30 cicli quando la concentrazione di DNA stampo è superiore alle 100 copie per reazione e la sua qualità è medio - alta.

Estensione finale

E' una pratica controversa che non ha trovato ancora precisi riscontri scientifici. Consiste nel mantenere la reazione ultimata per diverso tempo alla

temperatura ottimale per la DNA polimerasi. Ciò favorirebbe il completamento degli amplificati non terminati o imprecisi. Nel caso dei microsatelliti in reazione multiplex è stato osservato un miglioramento della struttura dei picchi quando questa fase è prolungata fino a 15 – 20 minuti.

Visualizzazione dei risultati

Per ottenere le informazioni necessarie dal processo di amplificazione si deve procedere all'elettroforesi dei prodotti di PCR. In passato i primi studi di microsatelliti utilizzavano differenti tecniche per la visualizzazione dei risultati, come il semplice agarosio o gel di formammide, fino a piastre con l'utilizzo d'isotopi radioattivi.

Il vero sviluppo della tecnica si è avuto con l'introduzione dei primi sequenziatori automatici e soprattutto dall'uso dei fluorocromi che permettono l'elettroforesi simultanea di numerosi frammenti.

L'elettroforesi sia in sequenziatore a gel di acrilammide (vecchia generazione) o capillare (nuova generazione) si basa sullo stesso principio della classica elettroforesi in gel di agarosio: migrazione di molecole di DNA cariche negativamente in un campo elettrico generato da due elettrodi di carica opposta. Il DNA, immerso in una soluzione tampone appropriata, migrerà dal polo negativo (catodo) verso il polo positivo (anodo). Nell'elettroforesi basate su gel la velocità di migrazione dei frammenti di DNA dipende dalla loro dimensione. Infatti, il reticolo tridimensionale caratteristico del gel, formato in seguito alla polimerizzazione del determinato monomero che lo caratterizza, opera una selezione in base appunto alla dimensione delle molecole che lo attraversano. A parità di potenziale elettrico i frammenti di DNA più grandi migreranno meno velocemente perché maggiormente trattenuti nel reticolo tridimensionale del gel, quelli più piccoli migreranno più velocemente perché non saranno ostacolati dalla struttura 3D. In virtù della diversa velocità di

migrazione quindi si riuscirà a separare i frammenti di DNA di differenti dimensioni.

Nel caso dell'elettroforesi capillare l'apparecchiatura è costituita da un capillare, caratterizzato dalla presenza di un polimero liquido selettivo (polimero POP), di diametro molto piccolo che contiene una soluzione tampone appropriata.

Il capillare è sottoposto ad una differenza di potenziale che causa la migrazione dei frammenti di DNA carichi negativamente verso l'estremità del capillare con polarità positiva.

Le molecole di DNA quindi migrano attraverso il polimero selettivo all'interno del capillare e sono separate in base alla loro dimensione: i frammenti più piccoli attraversano il polimero più velocemente, i frammenti di dimensioni più grandi attraversano il polimero più lentamente.

A differenza dell'elettroforesi tradizionale l'acquisizione del risultato è digitale e automatica, tramite un sistema computerizzato.

Si tratta di una telecamera ad acquisizione laser, posta all'estremità carica positivamente del capillare o del gel di acrilammide e in grado di intercettare le molecole di DNA, in modo indiretto, tramite la luce emessa dai fluorocromi legati a esse. Le molecole più piccole di DNA che migrano più velocemente saranno intercettate per prime dal sistema di rivelazione, mentre le molecole più grandi che migrano più lentamente saranno rivelate per ultime dal detector.

I fluorocromi sono di solito incorporati al prodotto di PCR tramite i primer. Nei protocolli più usati la molecola è legata all'estremità 5' del primer (*5' end – labelling*).

Quando il raggio laser emesso dalla macchina, colpisce le molecole fluorescenti, queste emettono un segnale in uscita, consistente in una luce di diverse lunghezze d'onda secondo il colore, poi registrato ed elaborato da un sistema d'integrazione dati.

Se si esegue una PCR multiplex, le varie coppie di primer dovranno essere marcate con molecole fluorescenti di colore diverso, in modo tale che il sistema di rivelazione sia in grado di discriminare frammenti caratterizzate dallo stesso

intervallo di dimensioni possibili (teoricamente sovrapponibili), ma che hanno avuto origine dall'amplificazione di sequenze target diverse.

Il risultato finale di questa separazione, rivelazione ed elaborazione dati, è un elettro - ferogramma, nella quale compaiono picchi elettroforetici, ognuno dei quali rappresenta un frammento di DNA che è stato separato durante la corsa. L'intensità del segnale è proporzionale alla quantità del frammento e determina l'area e l'altezza dei picchi.

I picchi di diverso colore rappresentano i prodotti di PCR marcati con differenti molecole fluorescenti. I picchi si localizzano in corrispondenza di precisi intervalli di dimensione che possono essere tradotti in paia di basi utilizzando uno standard di peso molecolare anch'esso marcato.

Le molecole fluorescenti (DYE) più comuni sono FAM (blu), NED (giallo), HEX (verde), VIC (verde), PET (rosso), ROX (rosso), LIZ (arancione).

La più moderna tecnica di elettroforesi capillare (Sobel *et al.* 2002; Hoffman & Amos 2005; Pompanon *et al.* 2005) presenta delle caratteristiche di maggiore efficienza rispetto alla più datata elettroforesi tramite gel di acrilammide: i frammenti di DNA sono visualizzati come picchi molto netti. Nell'elettroforesi basata su gel le bande che rappresentavano i diversi frammenti, si potevano allargare per fenomeni di diffusione, riducendo di conseguenza l'efficienza della separazione.

Presenta, inoltre, elevata risoluzione: i frammenti di DNA sono visualizzati come picchi ben separati l'uno dall'altro. Nell'elettroforesi basata su gel le bande rappresentanti, i diversi frammenti potevano con più facilità essere sovrapposte, diminuendo così il grado di separazione.

Tipizzazione

Dal sequenziatore automatico, qualsiasi sia il tipo, otteniamo un'immagine digitale (dell'intero gel o del singolo capillare) dell'elettroforesi eseguita.

Il sistema analitico produce un diagramma detto "raw data", nel quale compaiono i diversi picchi di assorbimento ottico corrispondenti alla lettura della telecamera a laser.

Il primo passo è tradurre questa immagine digitale in uno specifico spettrogramma che riassume il singolo campione. Questo passaggio è effettuato con appositi software, tra i quali Genescan (Applied Biosystems) o STRand (University of Davis) o il più moderno Genemapper (Applied Biosystems) che come vedremo, riassume tutte le funzioni necessarie alla definizione del genotipaggio. In questa fase la *raw data* è analizzata tenendo conto dello standard di peso molecolare analizzato congiuntamente ai campioni (ROX, TAMRA ecc); questo fa sì che, tramite il confronto con i picchi dello standard si assegna un ordine di grandezza anche ai campioni analizzati. Sono inoltre separati i picchi di differenti colori in diversi fluorogrammi.

Il secondo passo consiste nella fase di analisi del genotipo vera e propria. I criteri analitici fondamentali sono:

- **analysis method:** insieme di parametri definiti dall'operatore (*analysis method, size standard, panel*) che determinano gli algoritmi specifici di dimensionamento e genotipaggio usati dal software per analizzare tutti i campioni presenti in una corsa elettroforetica completa;
- **bin:** rappresenta una dimensione di un frammento (in paia di basi) e un colore della molecola fluorescente associata (*dye color*) che definiscono un allele senza però la presenza di alcun marcatore microsatellite. In altre parole è il range di dimensione, accompagnato da un colore della molecola fluorescente, in cui può venire a trovarsi un allele. L'operatore crea un bin per ogni possibile allele associato ad un marcatore microsatellite;
- **bin set:** rappresenta un gruppo o insieme di bin (*allele definitions*), tipicamente specifici per un set di condizioni sperimentali, e consente di convertire la dimensione del picco in categorie proprie dell'analisi (paia di basi lettere o numeri);
- **panel:** rappresenta un gruppo di marcatori microsatelliti. Nel software GeneMapper l'operatore associa un panel con un bin set per fornire le caratteristiche di definizione dei bin ai marcatori microsatelliti.

ERRORI DI TIPIZZAZIONE.

Come tutti i processi biologici riprodotti in laboratorio, anche l'analisi del DNA, per quanto sia tecnologicamente avanzata, non può prescindere da un certo tasso di errore legato a diversi fattori. Questo problema va ingrandendosi soprattutto con la possibilità che molti laboratori hanno di produrre un grande numero di dati un periodo relativamente basso (Mardis 2006), grazie all'enorme riduzione dei costi e all'introduzione di nuove piattaforme di automazione come *Illumina* (<http://www.illumina.com/>) ed ai progetti sorti negli ultimi tempi che si prefiggono di sequenziare un intero genoma animale a costi bassissimi (1000 dollari a genoma) e in tempi ristretti (Bonin *et al.* 2004).

Si definisce come errore di tipizzazione o di determinazione del genotipo la situazione in cui il reale genotipo, che consiste nella lunghezza reale in paia di nucleotidi o la sequenza del segmento di DNA, non corrisponde al genotipo determinato analiticamente (Marshall *et al.* 1998; Hoffman & Amos 2005). La presenza di errori nella determinazione del genotipo è stata riscontrata in numerosi data set di studi che interessavano un alto numero di microsatelliti, perché se è vero che questo marcatore è facile e pratico da studiare è anche vero che sia propenso ad un certo numero di errori (Taberlet *et al.* 1999; Hoffman & Amos 2005).

Anche un modesto tasso di errore può avere degli effetti negativi sulla stima dei vari parametri di inferenza, soprattutto negli studi di associazione, *linkage disequilibrium* e paternità ma anche nella stima del numero effettivo di popolazione e della variabilità genetica (Sobel *et al.* 2002).

Secondo diversi autori nel futuro, la percentuale di questo fenomeno è destinata ad aumentare, soprattutto nel caso del genotipaggio di numerosi SNPs, perché i processi di automazione non permettono di tener conto di problemi dovuti a mutazioni non previste nella sequenza del marcatore o nel sito di appaiamento dei primer (Presson *et al.* 2006) o di errori di confronto tra dati provenienti da data set ottenuti in altri laboratori e con altri macchinari. Ha destato molto interesse un episodio accaduto negli ambienti scientifici Americani in cui si riferisce che il primatologo Angier (1997), che aveva diffuso

una teoria basata su dati molecolari, secondo la quale le femmine di scimpanzé erano solite avere accoppiamenti casuali con maschi di altri gruppi sociali, dovette poi smentire la sua ricerca a causa di accertati errori di tipizzazione (Angier 2001), mentre, nel frattempo, aveva influenzato numerose ricerche in questo campo (Lincoln & Lander 1992).

Numerosi sono gli autori che si sono occupati di questo argomento, proponendo anche soluzioni statistiche per evitare o risolvere gli errori nella determinazione del genotipo (Wiparati 2003) o introducendo algoritmi statistici per il genotipaggio automatico sempre più sofisticati e sensibili (Hoffman & Amos 2005); tuttavia sono ancora pochi gli studi che prendono in considerazione l'origine e la frequenza dei possibili errori di determinazione del genotipo (Guo & Thompson 1992a).

Il metodo più affidabile per la determinazione di possibili errori in uno studio rimane l'analisi dell'equilibrio di Hardy – Weinberg (Gomes *et al.* 1999; Pompanon *et al.* 2005), ma si deve comunque puntare a conoscere quali possono essere le cause per poter opportunamente prevenire la maggior parte di essi (Taberlet *et al.* 1996).

❖ **Tipi e cause degli errori di determinazione del genotipo.**

Qualità del campione e a fattori intrinseci della sequenza

In molti casi la qualità del DNA utilizzata per l'amplificazione di un locus microsatellite è bassa e consiste in DNA molto diluito e degradato. Si Pensi ad esempio al materiale di partenza per le analisi forensi, dove si può essere costretti a lavorare con campioni provenienti da materiali biologici già compromessi (carne conservata, sangue coagulato, ossa ecc) o in cattivo stato di conservazione. Tutti questi fattori si traducono in ultima analisi un campione di DNA che può presentarsi con un contenuto sub ottimale di DNA

stampo e, inoltre, questo può essere frammentato (assenza di filamenti lunghi) sia a causa di metodi di estrazione aggressivi per rimuovere contaminanti o per disgregare i tessuti sia per la naturale azione di fattori naturalmente presenti nel campione (DNAasi, RNAasi, enzimi litici in genere, azione batterica).

La cattiva qualità del DNA può influire sulla corretta determinazione del genotipo non permettendo la visualizzazione di uno degli alleli in sede di amplificazione. Questo accade a causa del fenomeno detto *dropout* o “dei falsi omozigoti” in base al quale sono amplificati solo gli alleli più corti quando lo stampo è poco concentrato o compromesso (Lindahl 1993; Taberlet *et al.* 1996). Oppure, per lo stesso motivo si possono riscontrare “alleli falsi” fenomeno riscontrato quando vengono visualizzati picchi secondari e artefatti di PCR in luogo del vero allele (Valière & Taberlet 2000).

Secondo problema da non trascurare è che di solito i campioni di cattiva qualità (urine, feci e cadaveri) o provenienti da fonti difficili di estrazione (pelo animale, reperti forensi) sono più soggetti a contaminazioni. Ne deriva una certa probabilità di riscontrare alleli provenienti dall'amplificazione di DNA non appartenente al soggetto campionato e ciò può dare un risultato falsato (Walsh *et al.* 1992; Pompanon *et al.* 2005).

Una delle cause di errore più problematiche riguardano il fenomeno che paradossalmente è alla base dell'origine del marcatore stesso, la mutazione. Può accadere che nella sequenza complementare al primer possa verificarsi una mutazione che renderà l'amplificazione di uno dei due alleli problematica facilitando la comparsa di “alleli falsi”. Questo accade soprattutto quando la mutazione (più frequentemente causano più problemi le inserzioni/delezioni che i semplici SNP, poiché questi ultimi possono essere facilmente trascurati dalla polimerasi secondo il fenomeno della degenerazione) accade nell'estremità 3' della sequenza d'inserzione del primer (Peakall *et al.* 1998; O'Hanlon & Peakall 2000; Vekemans *et al.* 2002).

Se il polimorfismo avviene all'interno della sequenza del marcatore, si avrà invece il fenomeno “dell'omoplasia” che consiste nell'osservare un solo allele invece di due a causa dell'alterazione del numero di ripetizioni per opera della mutazione. Se, per esempio, abbiamo in un microsatellite dinucleotidico, due

alleli di lunghezza 14 bp e 16 bp, si avrebbe omoplasia quando per opera di un inserzione l'allele 14 avesse in realtà, lunghezza 15 bp, ricadendo nello stesso range allelico (stesso pattern elettroforetico) dell'allele 16 bp (Ginot *et al.* 1996).

Artefatti biochimici o legati all'attrezzatura

Un secondo tipo di errore è causato dai reagenti utilizzati in corso di realizzazione della reazione di PCR o semplicemente dell'elettroforesi.

Il caso più frequente è l'utilizzo di materiali di scarsa qualità (reagenti per analisi di routine vecchi e mal conservati) o l'utilizzo di strumenti che non abbiano la dovuta precisione. Infatti, accade sempre più spesso che con l'avvento di metodi di elettroforesi (apparati capillari) che richiedono una quantità sempre minore di prodotto amplificato, si sono andati diffondendo protocolli di reazione in piccoli volumi (10 o 5 µl di reazione). Questo ha massimizzato la possibilità che avvengano errori di pipettaggio dei reagenti o anche la parziale evaporazione del volume di reazione causato da provette o piastre per termociclatore di scarsa qualità. Questi inconvenienti possono tradursi oltre che nell'ottenimento di falsi alleli o falsi omozigoti, anche in picchi che presentano un rapporto falsato nelle dimensioni: ne sono un esempio alcuni alleli in cui alcuni picchi secondari propri del pattern elettroforetico del marcatore siano visualizzati con maggiore intensità e risoluzione dell'allele principale (*slipped mispairing*). Il fenomeno è dovuto alla temporanea denaturazione del DNA duplex seguita dalla non corretta rinaturazione e ciò può dar luogo alla formazione di una struttura a forcina o nel filamento stampo (il risultato è una delezione) o nel filamento neo-sintetizzato o nascente (il risultato è un'inserzione). Lo stesso effetto si ottiene nel caso di reazioni multiplex di microsatelliti quando non si sia provato la temperatura di appaiamento più adeguata o ancora non sia ottimizzata la concentrazione dei reagenti (MgCl₂, buffer PCR e dNTPs).

Durante la reazione di amplificazione, una grande serie di artefatti ed errori può essere causata dall'enzima DNA polimerasi per alcuni comportamenti

anomali della stessa. Uno dei più noti è il fenomeno detto del “*plus A*” secondo il quale la DNA polimerasi aggiunge un nucleotide all'estremità 3' di una sequenza, neo - sintetizzata con una certa frequenza, senza che ci sia effettivamente il nucleotide complementare sul filamento stampo. Questo effettivamente divide il picco elettroforetico rappresentante il prodotto di amplificazione in due differenti picchi. Il rapporto d'intensità di segnale fra il picco con l'originale dimensione e il picco *plusA* dipende dalla frequenza di addizione al 3'. Molti autori hanno definito differenti tecniche per regolare questo effetto. Alcuni consigliano di adottare un più lungo tempo di estensione per “forzare” l'enzima nell'aggiungere tale artefatto in tutti gli alleli, così da rendere costante la variazione. Altri autori suggeriscono l'utilizzo *post* - PCR della T4 DNA Polimerasi (Ginot *et al.* 1996; Oda *et al.* 1997): questo enzima riesce ad eliminare i nucleotidi e i frammenti secondari aggiunti dalla polimerasi in fase di estensione; viene applicata tramite una seconda incubazione.

Un'altra tecnica, detta “*PIG-tailing*” consiste nel migliorare la l'affidabilità del genotipo visualizzato, forzando il meccanismo del plus - A. In alcune prove si notò, infatti, che il fenomeno del Plus - A, non era costante ma avveniva sempre con una percentuale variabile negli amplificati, determinando una grande variabilità nei risultati. Inserendo l'oligonucleotide GTTTCTT all'estremità 5' si forza, all'estremità 3' del filamento Forward, l'adenilazione fino al 100% (Brownstein *et al.* 1996; Kohn & Wayne 1997).

Un altro tipo di errore può essere causato dall'amplificazione di sequenze aspecifiche, a causa delle condizioni sub ottimali alle quali sono sottoposti i primer di alcuni marcatori quando amplificati in reazione multiplex o della qualità del DNA di partenza (Wiparati 2003), ma è un problema facilmente risolvibile con la messa punto della reazione e con la scelta dei marcatori.

Infine, una grande quota degli errori di genotipaggio deriva dagli artefatti che possono prodursi nei sistemi di elettroforesi sia capillare sia a gel di acrilammide.

Il risultato ideale dell'elettroforesi dovrebbe produrre un picco chiaro e netto che si dirige verso il polo positivo dell'apparato. In realtà poiché le molecole di

DNA si trovano in una matrice tradizionale, sono sottoposte a una diffusione in tutte le direzioni, saranno visualizzate in maniera più espansa dell'atteso. In aggiunta ogni sistema di separazione elettroforetica, con acquisizione laser, produce un certo segnale di fondo ("rumore"), detto "*warp & e noise*" che può dare una certa riduzione della qualità del picco, soprattutto quando questo non sia chiaro e di dimensioni accettabili (figura 29).

Nell'elettroforesi a gel il problema principale, fonte di errore, è dovuto al fatto che la composizione della matrice elettroforetica non è costante, perché risente fortemente della manualità dell'operatore e può influenzare fortemente la migrazione del campione e la risoluzione del picco cromatografico. Errori nell'assemblaggio dei cristalli e delle parti del sequenziatore sono la preoccupazione principale di questo metodo di analisi. Ad esempio, uno degli errori più frequenti è dovuto alla cattiva regolazione del voltaggio e della temperatura del gel di acrilammide che può degradarsi nelle fasi finali del processo e perdere gran parte delle proprietà di matrice elettroforetica, a scapito dei frammenti di dimensioni maggiori.

Anche la preparazione dei campioni può influenzare negativamente il genotipo. Frequentissima è la cattiva denaturazione dei frammenti che formano così dei dimeri aspecifici, che falsano il reale genotipo; oppure la contaminazione degli strumenti di laboratorio con sostanze che inquinano l'immagine acquisita dal laser (detergenti per la vetreria non adatti, sostanze cosmetiche presenti sui guanti in lattice, spugne e strumenti abrasivi colorati).

Utilizzo di campioni troppo concentrati si traduce in un fenomeno negativo detto "*de-multiplexing*" che consiste in un'interferenza di alcuni fluorocromi (specialmente il FAM) sugli altri colori, fatto che si presenta in fase di genotipaggio con consistenti bande aspecifiche all'interno della finestra di lettura (Davison & Chiba 2003).

Alcuni autori hanno ultimamente provato anche in apparati a elettroforesi capillare l'influenza negativa delle condizioni ambientali, come la temperatura del laboratorio, sul processo di separazione che si esprime in ultima analisi con degli errori di tipizzazione (Black *et al.* 2001).

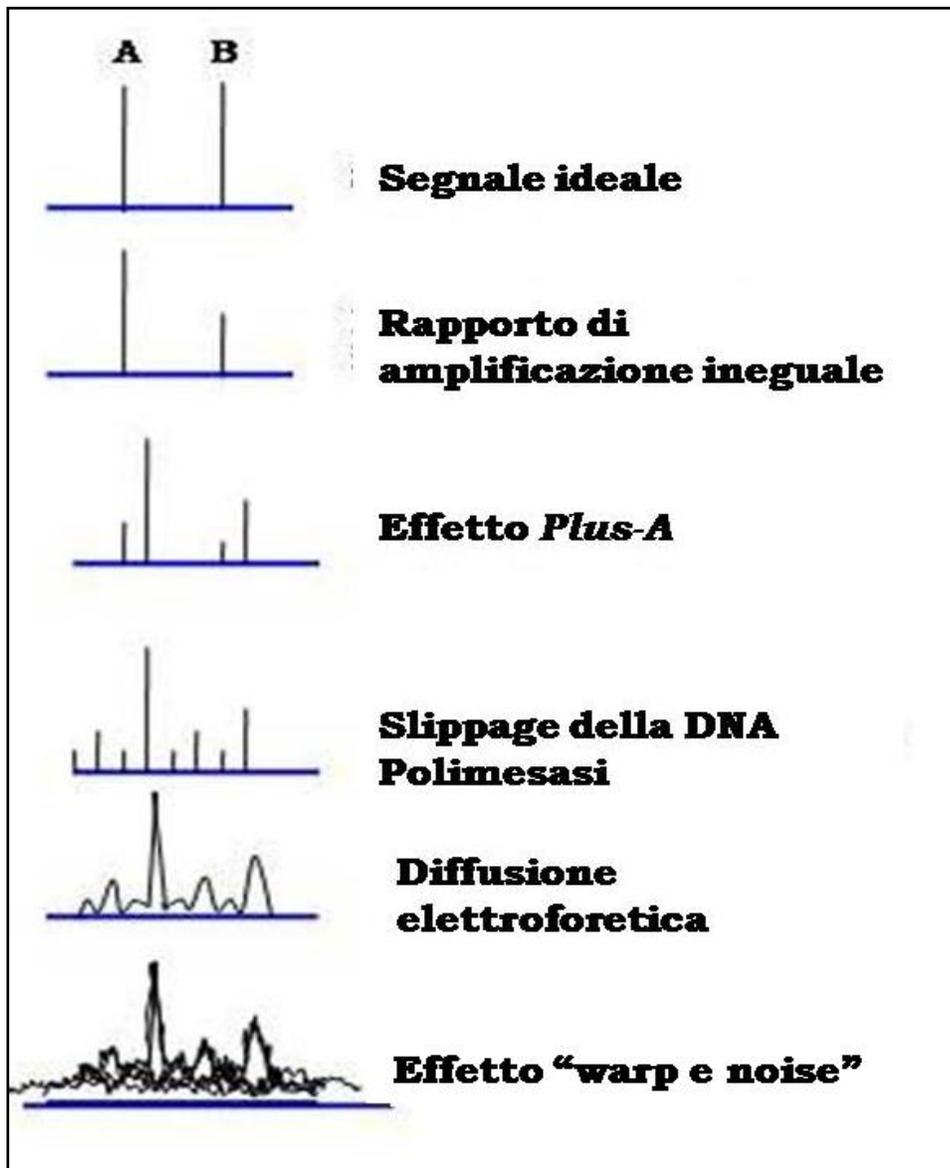


Figura 29: l'insieme dei fenomeni che influenzano la forma finale dei picchi in un individuo eterozigote.

STATISTICA E GENOMICA.

❖ **Genoma e popolazione**

La definizione di genomica si riassume nello studio delle popolazioni attraverso un campionamento su ampia scala e nell'analizzare un certo numero di loci in maniera simultaneamente (Luikart *et al.* 2003). Lo scopo è quello di identificare e isolare gli effetti dei singoli dei loci per evidenziare l'influenza della selezione naturale o artificiale (nel caso marcatori *linked* con geni sotto selezione), della mutazione e della ricombinazione.

In questo modo si separano questi singoli effetti dalla visione d'insieme dovuta al congiunto dei marcatori (*Genome wide effect*) che è invece influenzato da fattori più generali come la deriva genetica, la consanguineità e il *geneflow* (rimescolamento di gruppi di frequenze geniche differenti, ad esempio nell'incrocio) permettendo così la visione dei processi microevolutivi che sono alla base della differenziazione delle razze allevate (Bamshad & Wooding 2003). Ne deriva che analizzare un insieme d'individui con un approccio multi - locus è utile per capire le dinamiche demografiche e la storia evolutiva delle razze che si stanno studiando, mentre lo studio del comportamento di singoli loci che non hanno rispetto alla totalità un comportamento "neutro" si possono identificare gli effetti di geni o gruppi di geni che sono influenzati dall'ambiente e portano l'impronta della capacità di adattamento (Luikart *et al.* 2003).

Dal punto di vista statistico, quindi, l'analisi di marcatori neutri, come i microsatelliti, cioè che non si trovano in regioni codificanti, ma che singolarmente possono essere *linked* con queste, hanno un duplice:

1. gli eventi che provocano cambiamenti demografici e evolutivi di un gruppo d'individui assimilabile ad una razza influenzano in maniera equivalente tutti i marcatori presenti nel genoma (per esempio la riduzione del numero di eterozigoti dovuta all'isolamento geografico);

2. singoli loci sottoposti a selezione, perché legati a porzioni di genoma influenzate dall'ambiente o dalla selezione, deviano dall'andamento generale dei parametri statistici (un marcatore linked ad gene sotto effetto di una forte selezione avrà una delle caratteristiche statistiche molto lontane dall'andamento generale dell'insieme dei marcatori nel genoma).

❖ **Il disegno sperimentale.**

L'approccio molecolare ad uno studio di popolazione può essere riassunto dal modello proposto da Luikart *et al* (2003) composto da una fase accurata di campionamento e scelta del numero e tipo di marcatori, dall'analisi statistica dei loci "outlier" e dall'inferenza genomica sulla totalità dei loci neutri.

Prima fase: campionamento

La prima fase consiste nel campionamento del maggior numero di individui possibile della razza da studiare in conformità a diversi parametri che permettano l'oggettività dello stesso.

Il campionamento di un certo gruppo di individui dovrebbe, per diverse ragioni biologiche (Pritchard *et al.* 2000), essere condotto attraverso la distribuzione geografica degli animali e tenendo conto degli ostacoli (naturali e non) presenti nell'areale di allevamento.

Un esempio eclatante è quello delle razze ovine e caprine allevate nell'Italia centro – meridionale, nelle quali dovendo effettuare un campionamento tra i differenti greggi allevati in diverse regioni, non si può non tenere conto oltre che dei confini naturali (fiumi, valli e montagne) anche delle barriere sociali e politiche. Infatti, pur essendo allevate tra Lazio e Campania razze ovine filogeneticamente correlate, queste presentano una chiara diversificazione regionale a causa delle dogane tra Stato della Chiesa e Regno Borbonico, che

impedivano il libero transito delle greggi verso le zone commerciali di entrambi gli stati.

Inoltre, la raccolta di un certo numero di campioni da analizzare non dovrebbe essere basata su informazioni *a priori* che influenzino la casualità della scelta degli individui. Errore frequente, soprattutto nello studio degli animali domestici, è la raccolta dei campioni in base alle caratteristiche fenotipiche rispondenti allo standard di razza o in base a alcune posizioni geografiche preferenziali (provincia con più animali allevati o con più iscritti ai libri genealogici) che sono percepite come funzione di gruppi genetici che non sono tali nella realtà (Kimura & Ohta 1978).

Seconda fase: Il numero d'individui e di marcatori

Il problema principale della scelta di un adeguato numero di campioni per lo studio molecolare delle razze domestiche è capire quanto possa essere grande la biodiversità tra esse per scegliere un'adeguata potenza statistica.

Molti autori riportano che il tasso di mutazione dei marcatori frequentemente utilizzati, e soprattutto quello dei microsatelliti (particolarmente elevato), è di norma sufficiente a garantire, anche in archi di tempo relativamente brevi, una adeguata diversità genetica, tale da essere misurata con una certa affidabilità (Farnir *et al.* 2000).

Un'altra forza in grado di produrre grandi eventi di differenziazione è la deriva genetica, in altre parole il campionamento casuale di gruppi di frequenze alleliche che vengono separate fisicamente dal resto della popolazione, accumulando per effetto del caso, mutazioni differenti da essa (Medina *et al.* 2006). Questo è un fenomeno frequentissimo negli animali domestici, dove l'uomo di frequente opera spostamenti di piccoli numeri d'individui che vanno a formare altre popolazioni in località anche molto lontane. Ad esempio gli ovini di razza Merino esportati dai coloni inglesi in Australia, sono oggi geneticamente differenziati dai loro progenitori Europei, pur essendo trascorso poco tempo dalla loro separazione (Diez-Tascón *et al.* 2000).

Come norma generale il numero d'individui e di marcatori aumenta proporzionalmente alla mancanza d'informazioni che si hanno sul gruppo di animali da studiare per evitare il rischio di perdere preziose varianti geniche sulla popolazione oggetto di studio; quindi, più il processo di campionamento è incompleto o sensibile di errore, più la grandezza del campione deve essere grande (Nei 1978). In letteratura è frequente incontrare autori che suggeriscono in ogni caso l'uso di campioni con elevata numerosità per avere una buona stima dei parametri statistici (Kalinowski 2005). Altro fenomeno, provato anche tramite studi di simulazione è che quando si analizzano loci polimorfici la varianza del campione risulta elevata se la sua dimensione del campione è piccola (Nei 1987).

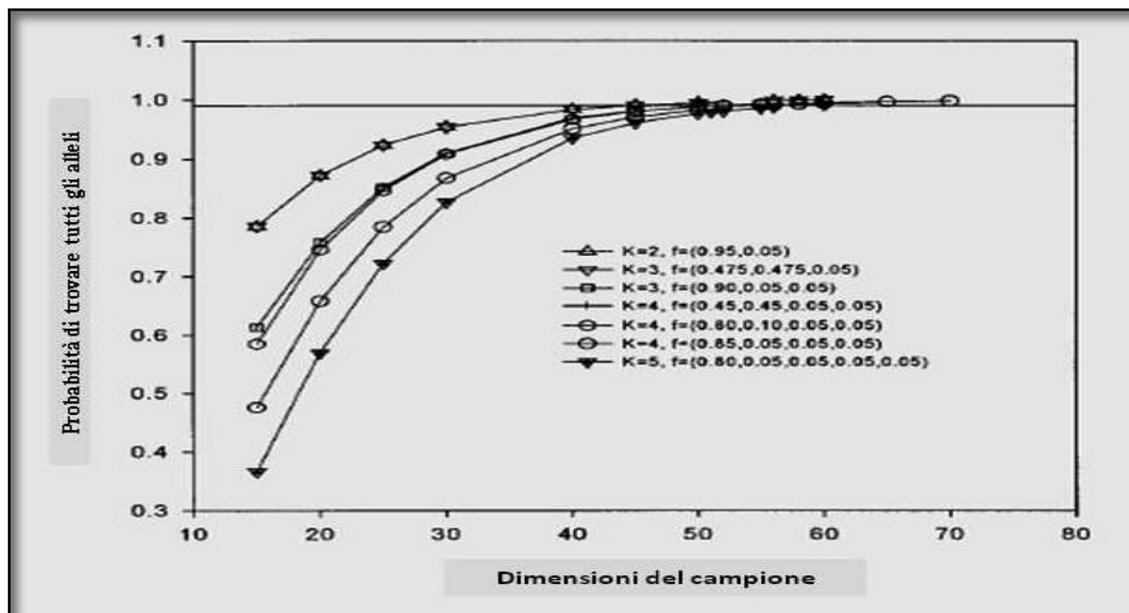


Figura 30: Tendenza del valore di probabilità di riscontrare tutti gli alleli di una popolazione per differenti valori di polimorfismo (K=numero di alleli) e differente dimensione del campione. La linea orizzontale indica il valore di probabilità del 99%. Modificato con il permesso dell'autore, (B-Rao 2001) e dell'editore (© 2008 S. Karger AG, Basel)

La misura della varianza di campionamento può comunque non essere un indicatore preciso del numero di campioni necessari poiché non tiene conto di eventi che perturbano la precisione della stima, quali un elevato tasso di mutazione di qualche marcatore.

Aumentare il numero di marcatori può essere una strategia alternativa all'uso di campioni di grandi dimensioni; inoltre, Nei *et al.* (2002) osservarono che quando il tempo di divergenza tra due gruppi era elevato ($F_{st} > 0,2$), aumentare il numero di loci è l'unica strada possibile per il calcolo delle distanze genetiche.

Riguardo al numero di loci è più appropriato riferirsi alla regressione tra numero di loci e quello dei campioni in base alle caratteristiche del marcatore.

Dalla figura 30 (B-Rao 2001) si evince, infatti, che in generale, all'aumentare degli alleli presenti in una popolazione deve anche aumentare il numero d'individui campioni per avere il 99% di probabilità di incontrarli.

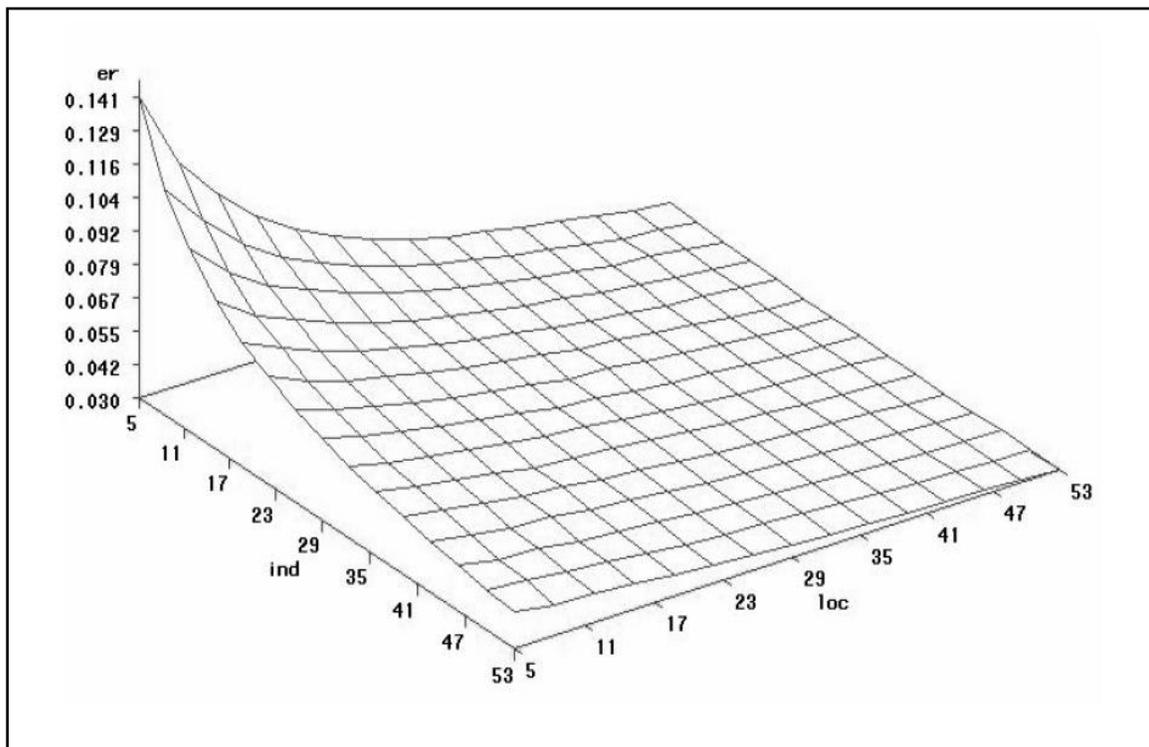


Figura 31: diagramma di risposta spaziale del valore del coefficiente F_{st} al variare dell'errore, numero di individui e loci utilizzati (con il permesso dell'autore, Quiroz 2007).

Kalinowski (2002) ha proposto un metodo basato sulla stima dell' F_{st} dal quale si può evincere che per gli studi di differenziazione genetica e biodiversità sono sufficienti circa 30 – 35 individui per popolazione e 29 loci per avere una probabilità di errore del 5% (figura 31).

Terza fase: test degli “outlier” loci

Questa è la fase più importante dell'analisi effettiva dei dati molecolari, in quanto, vuole isolare l'effetto di quei loci che non si comportano secondo il modello di un marcatore neutro. Questi sono i marcatori che per alcune ragioni, non sempre chiare, non seguono la legge dell'equilibrio di Hardy-Weinberg o sono ereditati non in base alle leggi di Mendel. In altre parole, si ricerca il deficit o l'eccesso di eterozigoti all'interno di una popolazione in base all'Equilibrio di HW.

La presenza di anche pochi loci “outlier” può cambiare radicalmente il risultato della metanalisi demografica sulla popolazione in studio (Wilding *et al.* 2001).

I test utilizzati per studiare questo fenomeno all'interno della tendenza generale dei marcatori sono diversi, ma lo scopo principale è capire se il fenomeno dipende da errori di genotipaggio (alleli falsi, falsi omozigoti) o da errori di campionamento e deriva genetica casuale.

La strategia principale consiste, come già detto, nel porre estrema cura nel campionamento e nella combinazione delle informazioni su habitat, morfotipo e posizione geografica. Solo se gli stessi loci mostrano uno stesso comportamento *outlier*, tra popolazioni distanti geograficamente, si avrà una chiara influenza della selezione su di essi (Luikart *et al.* 2003).

Il primo metodo per eseguire il test per definire il comportamento *outlier* di un marcatore, come già accennato nel capitolo riguardante gli errori di tipizzazione, è l'utilizzo di diversi algoritmi che testino la deviazione dall'equilibrio di HW delle frequenze alleliche del campione in studio.

Questo consiste nell'osservare tutte le possibili combinazioni di frequenze alleliche per un determinato gruppo di frequenze alleliche (nell'ambito di una razza, o gruppo geografico) determinando la probabilità (*p-value*) di effettuare un errore definendo le suddette frequenze inusuali secondo il modello teorico di Hardy-Weinberg tramite un algoritmo basato sulle *Catene di Monte Carlo-Markov* (Guo & Thompson 1992a).

Si può utilizzare come semplice metodo per lo studio delle perturbazioni dell'equilibrio di HW di alcuni marcatori, il confronto tra eterozigosità

osservata, cioè il numero di loci eterozigoti effettivamente misurati (H_o) e attesa (H_e) cioè quella prevista dalle frequenze alleliche, secondo l'equilibrio di HW. Infatti, se si assume che la popolazione analizzata sia in equilibrio non dovrebbe aversi delle differenze sostanziali tra i due valori. Il calcolo dell'eterozigosità attesa (H_e) anche definita diversità genetica può essere calcolata tramite la formula proposta da Nei (Nei & Maruyama 1975):

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

dove x_i è la frequenza dell' i -esimo allele e k è il numero di alleli.

Una metodica molto potente e utile per capire come sono distribuite le frequenze alleliche, sia nei singoli marcatori che in una o più popolazioni è quella proposta da Wright (Wright 1969); consiste nel suddividere un gruppo d'individui in base alla distribuzione delle frequenze alleliche definendo tre parametri principali: F_{is} , F_{it} e F_{st} .

I tre parametri possono essere spiegati tramite la seguente equazione:

$$F_{st} = 1 - \frac{1 - F_{it}}{1 - F_{is}}$$

Il livello di deficit o eccesso di eterozigoti può essere calcolato su tre livelli definiti dai relativi coefficienti. In altre parole, possiamo analizzare il difetto di eterozigoti tra individui confrontati con la sottopopolazione (nel nostro caso potrebbe essere una razza) con il coefficiente F_{is} , tra le sottopopolazioni all'interno del campione calcolando il coefficiente F_{st} (tra le razze o gruppi) e infine il F_{it} se si considera il difetto di eterozigoti dell'individuo rispetto alla totalità del campione (ovvero non considerando l'esistenza delle razze). Questo

fenomeno a carico delle frequenze alleliche che comporta una riduzione o un aumento del numero di eterozigoti rispetto all'atteso può essere causato da differenti fattori come la consanguineità, l'isolamento genetico e la migrazione di gruppi d'individui (Arcos-Burgos & Muenke 2002). In sintesi questi coefficienti misurano la relazione tra coppie di geni in relazione a diverse suddivisioni (Weir & Cockerham 1984). I tre coefficienti possono essere calcolati secondo le seguenti equazioni:

$$F_{IS} = 1 - \frac{\bar{H}}{\bar{H}_{e_s}} \quad F_{IT} = 1 - \frac{\bar{H}}{\bar{H}_{e_t}} \quad F_{ST} = 1 - \frac{\bar{H}_{e_s}}{\bar{H}_{e_t}}$$

Dove H è la frequenza osservata degli eterozigoti, mentre H_{e_s} e H_{e_t} sono rispettivamente la frequenza attesa di eterozigoti nelle sottopopolazioni e nel campione totale.

Quarta fase: lo studio genomico per l'inferenza di popolazione

L'ultima fase consiste nello studio d'inferenza sulla struttura demografica e la storia evolutiva delle popolazioni basandosi sui loci neutrali, in altre parole dopo aver escluso dal data set i loci *outlier*.

Gli approcci perseguibili in questa fase sono due: quello che richiede informazioni *a priori* (razza, provenienza, numerosità) sugli individui analizzati ed è la branca più datata della biostatistica e quello che pratica un'inferenza statistica senza bisogno d'informazioni prelieve per l'analisi e riguarda la più moderna branca dell'inferenza Baynesiana (Pritchard *et al.* 2000; Evanno *et al.* 2005). Si rimanda ai due capitoli successivi per una trattazione più approfondita.

❖ **Metodi d'inferenza classici****Distanze genetiche**

Una distanza tra due punti o insiemi di numeri, dal punto di vista meramente matematico, è definita da alcune regole fondamentali. Dato un insieme \bar{X} di numeri, si definisce distanza o metrica una qualsiasi funzione del tipo:

$$d = X \times X \rightarrow \mathbb{R}$$

che soddisfa le seguenti proprietà per ogni scelta di x, y, z in X :

- $d(X, Y) \geq 0$
- $d(X, Y) = 0 \leftrightarrow Y = X$
- $d(X, Y) = d(Y, X)$
- $d(X, Y) \leq d(X, Z) + d(Y, Z)$

In termini biologici è necessario aggiungere a quest'assunzione generale altre regole fondamentali che tengano conto di alcuni fenomeni legati all'evoluzione delle popolazioni. Innanzitutto, bisogna considerare il modello di divergenza utilizzato in virtù del fatto che i diversi marcatori hanno differenti pattern di evoluzione e che le popolazioni si differenziano a seconda del tipo e dell'intensità delle forze evolutive che le influenzano come la mutazione, la selezione, la migrazione e la deriva genetica (Martinez 2001).

L'utilizzo delle distanze genetiche per lo studio delle razze allevate è stato ultimamente messo in discussione perché inizialmente tutti gli algoritmi sono stati disegnati per lo studio della divergenza tra specie e non tra razze e vanno a cercare il punto specifico dove una popolazione si converte in una altra distinta, senza considerare la migrazione e la selezione che invece sono il principale fattore di differenziazione nelle razze domestiche.

Pertanto, la diversità genetica osservata è determinata solamente sui parametri di deriva genetica e mutazione per periodi molto lunghi. Nello studio dei microsatelliti nelle razze domestiche si può in effetti ignorare l'effetto della mutazione non essendo, di norma, molto lunghi i tempi di divergenza (Martinez 2001; Quiroz 2007).

Come semplificazione generale tutte le distanze genetiche introdotte durante gli anni di vari studiosi possono essere divise in due metodi principali: basate nella distribuzione delle frequenze alleliche (Gower 1966; Nei 1972; Rogers 1972; Goodman 1973; Nei 1973; Gregorius 1974) Reynolds (Cavalli-Sforza & Edwards 1967; Reynolds *et al.* 1983) e basate sulla distribuzione della dimensione degli alleli: Goldstein (1995a), Shriver (1993) y Slatkin (1995).

La distanza genetica più comunemente utilizzata (Baumung *et al.* 2004) è la distanza introdotta da Nei (1972) detta "Standard" o "Ds". Riportiamo l'equazione per il suo calcolo:

$$D_s = -\log_e I$$

Dove I è la misura dell'identità genetica stimabile da due popolazioni X e Y:

$$I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$$

Dove J_{xy} , J_x e J_y sono le sommatorie delle probabilità di incontrare due geni identici rispettivamente tra le popolazioni X e Y, solo nella X e solo nella Y.

Come buona norma è preferibile calcolare un certo numero di distanze e confrontarle unitamente a diverse assunzioni sulle dinamiche di formazione.

In generale una maniera schematica per la scelta della distanza più adatta è stata fornita da Eding e Laval (1998) basandosi sul tempo di divergenza (tabella 2):

Tempo di divergenza	Corto	Medio	Alto
Metodo	(razze della stessa area geografica)	(razze lontane geograficamente)	(specie differenti)
Modello di divergenza	Deriva genetica	Mutazione e deriva	Mutazione e deriva
D_C (Cavalli-Sforza & Edwards 1967)	-	+	+
D_A (Nei 1972)	-	+	+
D (Nei 1971)	-	+	+
$(\delta\mu)^2$ (Goldstein <i>et al.</i> 1995)	-	+	+
D_M (Nei 1975)	±	-	-
D_R (Reynolds <i>et al.</i> 1983)	+	-	-

Tabella 2: possibilità d'uso di alcune principali distanze genetiche in base al modello e alle dimensioni della divergenza (Eding & Laval 1998).

Visualizzazione grafica delle distanze genetiche

La denominazione di questo calcolo statistico dal quale si ottiene un diagramma di relazioni tra individui o gruppi d'individui, è oggi terreno fertile per aspre discussioni (spesso tra biologi evolucionisti, molecolaristi e zoologi). In effetti, anche nelle pubblicazioni che riguardano lo studio della diversità genetica per mezzo di marcatori molecolari, non esiste una definizione comunemente usata, trovando quasi in egual modo il nome di albero filogenetico, dendrogramma, albero delle distanze, diagramma filogenetico, cladogramma.

Cerchiamo di dare una definizione basandoci sull'effettivo significato dello studio genomico con marcatori molecolari.

Secondo la definizione di Rita Levi Montalcini la filogenesi è *“un processo evolutivo degli organismi vegetali e animali dalla loro comparsa sulla Terra a oggi”*. E quindi anche delle relazioni grafiche tra individui basate su dati molecolari, possono essere definite come *“albero filogenetico”*. C'è però da tener conto che: le relazioni molecolari tra razze non sono sempre di tipo *“evolutivo”*, ma spesso demografico; in altre parole, ci sono differenze statistiche, portate

dalla deriva genetica e dalla migrazione piuttosto che a eventi di mutazione che possono portare all'evoluzione propriamente detta. In questo caso appare più adeguata la definizione di dendrogramma, cioè il diagramma costruito sulle matrici calcolate con algoritmi dedicati e indicante la forza delle relazioni esistenti tra due elementi in base alla distanza che intercorre tra l'origine (0) e la linea verticale più vicina che connette le linee orizzontali corrispondenti ai due elementi considerati. Questo è vero quasi sempre...se si utilizzano marcatori molecolari come il DNA mitocondriale e si cercano, in genere, mutazioni ancestrali che riportino a momenti di speciazione molto antichi in questo caso allora apparirebbe più indicata la definizione di albero filogenetico. È necessario fare un po' di chiarezza sui due metodi statistici per il calcolo di un "albero", quello *fenetico* e quello *cladistico* già in uso nelle scienze evolutive basate sulle caratteristiche fenotipiche, come le analisi sui marcatori biochimici.

Il metodo fenetico di cui fanno parte gli algoritmi UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*) (Sneath & Sokal 1973) e il Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), consiste nel costruire il diagramma in base alle caratteristiche simili assolute (misure fenotipiche, diversità allelica), comuni a più popolazioni.

Il metodo cladistica, invece, costruisce alberi evolutivi tenendo conto di tutti i possibili cammini evolutivi (punti di ramificazione dove i gruppi divergono da un antenato comune). Si basano su questo metodo gli algoritmi detti di *parsimonia* (il minimo numero di cambiamenti evolutivi) e di *massima verosimiglianza* (maggiore probabilità di ottenere i dati osservati).

Il metodo cladistico sarebbe più preciso per i dati di origine molecolare in quanto tiene conto dell'evoluzione dei diversi gruppi di individui, ma molte volte non si è in grado di decidere quale importanza e peso dare ad un determinato dato. Infatti, l'utilizzo del metodo cladistico presuppone la conoscenza da parte dell'operatore dell'ordine temporale di una mutazione (mutazione ancestrale) e della sua importanza (mutazione di speciazione); in assenza di tali informazioni i metodi fenetici risultano più appropriati. In

conclusione, il metodo più appropriato va scelto in base ai dati sperimentali, mediando tra le due teorie statistiche.

Tornando al diverbio sulla giusta definizione, possiamo dire che è un problema squisitamente lessicale, infatti, pur essendo i dati molecolari di origine e comportamento differente da quelli morfologici e biologici, sono trattati con gli stessi metodi statistici filogenetici, perché intesi come variabili “fenotipiche” profonde.

Senza addentrarsi nello specifico, aggiungeremo che l’affidabilità statistica di un albero delle distanze filogenetiche può essere, infine, testato per la forma più probabile con differenti metodi detti del “ri - campionamento”, con i quali si costruiscono un certo numero di alberi cercando la forma più probabile che più riassume le caratteristiche degli altri; tra questi ricordiamo il *Bootstrapping*, il *Jackknife* e il metodo per permutazioni (Felsenstein 2004).

Un algoritmo più recente per la costruzione di alberi filogenetici è il metodo “*network*” o alberi a rete. Questo metodo tiene conto di tutti quei processi biologici che complicano la stima dell’effettiva distanza tra due gruppi d’individui, ragione per la quale sia il metodo *fenetico* che quello *cladistico* sono incompleti. Ad esempio, la ricombinazione in fase di produzione dei nuovi gameti tende a riunire gruppi di alleli inizialmente divergenti, creando una “falsa” somiglianza genetica. Nello studio delle razze domestiche, la cui divergenza non è così chiaramente dicotomica come nelle specie selvatiche, questo metodo appare molto efficace, poiché permette l’immissione di variabili non considerate dagli altri metodi, come la ricombinazione, il flusso genico (geneflow) e le mutazioni ricorrenti. Nella pratica un dendrogramma *network*, consiste nel costruire, tramite vettori, un diagramma filogenetico che riassume tutte le possibili combinazioni, non imponendo una scelta più probabile. I punti di divergenza tra i rami del dendrogramma vengono, infatti, rappresentati da una rete che mostra tutti i possibili passaggi evolutivi.

❖ **Metodi d'inferenza probabilistici**

L'inferenza basata su metodi probabilistici è un branca relativamente recente della statistica applicata allo studio della biodiversità.

Si tratta di algoritmi che trattano, tramite un modello parametrico, gruppi di parametri (individui, genotipi multilocus e frequenze alleliche) calcolando la probabilità che i dati reali siano attinenti al totale. Sono per questo utilissimi per stimare la probabilità di assegnazione di un individuo a una popolazione in schemi di tracciabilità molecolare.

L'inconveniente è che tutti i metodi di questo tipo presuppongono che tutti i dati si trovino in equilibrio di HW. Si ritrovano due tipi principali di algoritmi di assegnazione: quelli basati sulle frequenze e quelli basati sulla probabilità a priori con metodo Baynesiano.

Il primo tipo calcola la frequenza allelica delle popolazioni potenziali e restituisce poi per ogni individuo, la probabilità che il suo genotipo multi locus si ritrovi nella popolazione (gruppo di frequenze alleliche simili) con la massima verosimiglianza.

Il secondo tipo è simile nella forma al primo, ma cambia nel tipo d'indagine basato sulle Catene di Monte Carlo Markow, che assume una probabilità a priori K inferendo le frequenze alleliche degli individui analizzati, X :

$$\Pr(K/X) \propto \Pr(K/X) PrK$$

Presupposto che il campionamento si sia effettuato in maniera oculata e che non ci siano interazioni di *linkage* tra i loci (Falush *et al.* 2003) si procede considerando il genotipo multilocus degli individui senza assumere alcuna struttura di popolazione nel campione (Pritchard *et al.* 2000).

Il primo passo consiste in seguito nello studio della discendenza degli individui campionati seguendo due modelli, uno non - combinato, nel quale si assume che gli individui siano provenienti in maniera diretta, da una delle K

popolazioni assunte dal modello e uno combinato che ammette il mescolamento (geneflow) degli ascendenti, ovvero si presuppone una certa probabilità che una quota del genotipo dell'individuo, q_K , venga dalla popolazione K. Esiste anche un altro tipo di modello sviluppato da Falush (2003) che permette di stimare la struttura di popolazione ammettendo il *linkage disequilibrium* tra marcatori, tramite una combinazione che permette di stimare oltre che la probabilità di un individuo di essere assegnato ad un cluster di frequenze alleliche anche la correlazione tra marcatori.

IL DNA MITOCONDRIALE

❖ **Teoria evolutiva dei mitocondri**

Esiste una teoria evolutiva oggi sull'origine dei mitocondri: questi organelli deriverebbero da una relazione di endosimbiosi tra una cellula e dei batteri aerobi responsabili del metabolismo ossidativo, associazione che fu benefica e col tempo portò i genomi dei batteri a incorporarsi nel genoma nucleare della cellula, così che solo alcuni componenti dei mitocondri continuano ad essere codificati dal DNA dell'organulo, mentre nel genoma nucleare si ritrovano quei geni che codificano le proteine per la replicazione e trascrizione dello stesso DNA mitocondriale e quelle coinvolte nel metabolismo del mitocondrio.

Questa teoria è stata dimostrata dalla forte similitudine tra il DNA mitocondriale e quello della *Rickettsia prowazekii* un parassita cellulare che si può riprodurre all'interno delle cellule eucariote, le cui sequenze suggeriscono la presenza di un antenato comune dal quale si originò il sistema genetico dei mitocondri attuali.

❖ **Il genoma mitocondriale**

Oltre ad essere il motore della cellula, i mitocondri mantengono al loro interno un proprio DNA diverso da quello presente nel nucleo, che si replica ogni volta che l'organulo si divide e la trascrizione dei geni che questo contiene avviene all'interno dello stesso mitocondrio.

Il genoma mitocondriale è una molecola circolare di DNA come quello batterico ed è presente in diverse copie; le dimensioni variano secondo la specie, infatti, il genoma mitocondriale umano e quello della maggior parte degli animali è circa 16kb (16 migliaia di basi), mentre quello delle piante può essere lungo dalle 200 alle 250kb e quello dei lieviti 80kb.

Nonostante le grosse dimensioni, questi genomi sono composti in maggioranza da sequenze non codificanti e sembra che non contengano molta informazione genetica.

Per esempio, il genoma mitocondriale più grande sequenziato appartiene alla pianta *Arabidopsis thaliana*, che ha circa 367 kb e codifica solo per 32 proteine, cioè poco più del doppio delle proteine codificate dal DNA mitocondriale umano.

Il DNA mitocondriale si differenzia per le dimensioni dal genoma nucleare (è costituito da circa tre miliardi di pb nell'uomo), per la ploidia (la ploidia è il numero di cromosomi omologhi in una cellula), per il meccanismo ereditario, per il grado di ricombinazione, per il numero d'introni, per il numero effettivo di popolazione, per il tasso di mutazione e meccanismi di riparazione.

Il DNA mitocondriale codifica per i geni che codificano per le proteine della fosforilazione ossidativa, per l'RNA ribosomiale (RNAr) e per quello di trasferimento (RNAt), necessari per la traduzione nei mitocondri di queste sequenze codificanti.

Altre proteine mitocondriali sono codificate da geni nucleari e si pensa che siano stati trasferiti al nucleo dal genoma mitocondriale antico.

Il genoma mitocondriale codifica attraverso trentasette geni, tredici proteine implicate nel trasporto di elettroni e nella fosforilazione ossidativa, due RNA ribosomiali (r - RNA 16S e 12S) e ventidue RNA transfer (t - RNA) che servono per la traduzione delle proteine codificate dal genoma dell'organulo.

I trentasette geni non presentano introni, mostrano zone di sovrapposizione e possono essere contigui o separati da uno o due codoni.

Il piccolo numero di t - RNA codificato dal genoma mitocondriale mostra una caratteristica di questo sistema genetico: l'utilizzo di un codice genetico differente da quello "universale" tipico delle cellule eucariote e procariote, nel quale ci sono 64 codoni possibili, di cui 61 codificano i venti aminoacidi incorporati nelle proteine e 3 sono codoni terminali e sono necessari almeno trenta t - RNA diversi.

Il DNA mitocondriale umano, invece codifica solo 22 tipi di t - RNA, che sono quindi gli unici utilizzabili per la traduzione degli RNA messaggero (m - RNA)

mitocondriale, e questo comporta una forma diversa di appaiamento in cui la U nell'anticodone del t - RNA si può accoppiare con qualunque delle quattro basi nella terza posizione del codone dell'm - RNA , facendo sì che un unico t - RNA riconosca 4 codoni (Sbisà *et al.* 1997).

Per lo più nei mitocondri alcuni codoni codificano aminoacidi distinti dal codice "universale".

Il genoma mitocondriale è molto compatto, con le due regioni non codificanti che occupano meno del 7% dell'intero genoma. La principale regione non codificante, lunga circa 1200 nucleotidi, va sotto il nome di regione di controllo (*control region*) all'interno della quale si trova il D-loop o regione ipervariabile (*hypervariable region*, HVR).

Il primo termine si riferisce al fatto che questa regione contiene i segnali che controllano la sintesi di DNA e RNA; il nome D-loop è riferito alla prima fase della replicazione, quando il filamento neosintetizzato forma una bolla o "loop" e il termine regione ipervariabile è utilizzata a causa della presenza di mutazioni puntiformi che occorrono con una frequenza dieci volte maggiore rispetto a quella del DNA nucleare.

Questa struttura principale non codificante è creata dall'iniziale catena pesante (H-strand) del genoma e l'altra regione non codificante, più piccola della prima, localizzata a 11kb dal D-loop in direzione della replicazione include l'origine del filamento leggero (L-strand).

Sbisà *et al.* (1997) analizzarono 27 sequenze D-loop di dieci ordini di mammiferi e mostrarono che possono essere identificati tre domini nella regione D-loop:

- sequenze associate alle terminazioni estese (ETAS) che si estendono da tRNA-Pro (tRNA per l'amminoacido Prolina) al dominio centrale; il dominio centrale (CD);
- il blocco delle sequenze conservate (CBS) dal dominio centrale al tRNA_Phe (tRNA per l'amminoacido Fenilalanina).

Il dominio centrale è molto conservato in tutte le specie e le sue funzioni sono ancora piuttosto oscure, e presenta un basso livello di asimmetria rispetto al resto della regione.

La regione ETAS corrisponde al dominio 38 del D-loop che si estende tra il tRNA per l'amminoacido Pro e il dominio centrale e contiene due blocchi conservati, chiamati ETAS1 ed ETAS2, che contengono le TAS, che sono sequenze associate alla terminazione della catena pesante nei mammiferi.

Sulla base di dati sperimentali, è stato suggerito un ruolo funzionale di queste sequenze conservate (Walberg & Clayton 1981); ETAS1 potrebbe contenere segnali di riconoscimento per la terminazione della catena iniziale.

La regione CBS si estende tra il CD e il gene che codifica per il tRNA per l'amminoacido fenilalanina ed è funzionalmente importante perché contiene l'origine della replicazione del filamento pesante (OH), i promotori dei due filamenti (HSP e LSP) e tre blocchi conservati (CSB1, -2 e -3) che Walberg e Clayton (1981) suggerirono fossero coinvolti nella genesi di RNA-primer per la replicazione del filamento pesante.

I domini ETAS e CSB evolvono molto più rapidamente che il dominio centrale (CD), in particolare mostrano sufficiente variazione intraspecifica per essere usata per analisi genetiche di popolazione, soprattutto nella specie umana, nella quale hanno contribuito notevolmente nel fare luce sull'origine dell'uomo moderno (Excoffier & Yang 1999).

L'evoluzione della regione D-loop del DNA mitocondriale dei mammiferi mostra alcune peculiari caratteristiche, come il forte tasso di eterogeneità tra i siti, la presenza di *tandem repeats*, l'alta frequenza di eventi di inserzione e delezione in alcuni tratti della molecola e specificità per la linea materna (Saccone *et al.* 1993; Sbisà *et al.* 1997).

Ugualmente al DNA nucleare (DNAn) il mtDNA si può alterare per mutazione e frequentemente queste possono essere nocive per l'organulo.

Poiché quasi tutti i mitocondri dell'ovulo fecondato sono apportati dall'ovocita invece che dallo spermatozoo, le mutazioni germinali in essi presenti, sono trasmesse alla generazione seguente dalla madre e sono quindi ereditate per via materna, infatti, i mitocondri paterni, presenti nella coda dello

spermatozoo, sono persi nel momento della fusione dei due pronuclei. Si deve ricordare dall'altro canto che alcuni autori sarebbero concordi nell'ammettere una certa quota di eredità paterna del mtDNA, a seguito di alcuni organuli che rimangono ancorati all'ooocita in fase di fecondazione.

	GENOMA NUCLEARE	GENOMA MITOCONDRIALE
Dimensioni	3300 mb	≈ 16 kb
N° di cromosomi omologhi	23	Una unica molecola circolare
N° di copie per cellula	1	Alcune migliaia circa 8000 per cellula in alcuni tipi
Proteina associate	Alcune classi di proteine istoniche e non istoniche	Assenti
Numero di geni	≈ 30000-80000	37
Densità geni	≈ 1/40 kb	1/0, 45 kb
DNA ripetitivo	Lunghe frazioni	Molto piccole
Trascrizione	La maggioranza dei geni sono trascritti individualmente	Trascrizione continua di geni multipli
Introni	Presenti	Assenti
% di DNA codificante	≈ 3	≈ 93
Ricombinazione	Almeno una volta per ogni coppia di cromosomi omologhi durante la meiosi	Non evidente
Eredità	Mendeliana per gli autosomi e per X e parte ricombinante di Y e, paterna per la parte non ricombinante del cromosoma Y	Materna, attraverso il citoplasma della cellula uovo. (Eredità paterna ?)

Tabella 3: Alcune caratteristiche del DNA mitocondriale a confronto con quello nucleare.

Il tasso di mutazione del DNA mitocondriale è generalmente più alto di quello del DNA nucleare, e Brown *et al.* (1979) dimostrarono che il tasso di evoluzione del DNA mitocondriale nei primati era approssimativamente del 2% ogni milione di anni. Inoltre, dimostrarono anche che il tasso di evoluzione del DNA mitocondriale supera quello della frazione a singola copia del genoma nucleare per un fattore dieci, anche se non si può assumere che tutto il DNA mitocondriale evolva al 2% ogni milione di anni e con una velocità superiore dieci volte rispetto al DNA nucleare.

Moriyama e Powell (1997), infatti, compararono tassi di sostituzione simili, definiti come il numero di mutanti che raggiungono la fissazione per generazione, tra DNA mitocondriale e nucleare in *Drosophila* e trovarono che i geni del primo presentavano velocità 1/4 volte superiori al più veloce gene nucleare e 4/9 volte superiore alla media dei geni nucleari.

La filogenetica stima che il tasso di mutazione può essere influenzato dalle dimensioni effettive della popolazione (N_e) e le popolazioni piccole possono accumulare mutazioni mitocondriali deleterie ad una velocità più elevata (Bergstrom & Pritchard 1998).

Mutazioni sbagliate possono influenzare l'evoluzione del DNA mitocondriale ed esiste molta eterogeneità del tasso di mutazione nella regione ipervariabile (Penny *et al.* 1995; Malyarchuk *et al.* 2002) e in altre parti della molecola (Ballard 2000) che potenzialmente possono causare problemi nell'inferenza filogenetica e filogeografica.

Le peculiari caratteristiche del mtDNA dei vertebrati, come l'eredità materna, la presenza di una singola copia di geni ortologhi (due sequenze omologhe sono dette ortologhe se sono in specie diverse), la mancanza di ricombinazione, e l'alto tasso di mutazione, rendono questa molecola particolarmente utile per studi evolutivi, filogenetici e filogeografici.

❖ **Il genoma mitocondriale ovino**

La molecola completa di DNA mitocondriale della pecora domestica *Ovis aries*, fu sequenziata dall'aplogruppo europeo (B), da Hiendleder *et al* (1998b) che unito a quello asiatico (A) costituiscono i due aplogruppi di ovini maggiormente rappresentati.

Un aplogruppo è un gruppo di aplotipi tra loro differenti, tutti, però, originati dallo stesso aplotipo ancestrale; e per questo, per quanto differenti, tutti gli aplotipi di un aplogruppo presentano mutazioni presenti nella forma ancestrale, più ulteriori polimorfismi che invece li rendono specifici e differenti tra di loro.

I risultati sono stati conseguiti con l'estrazione e purificazione di DNA da campioni di fegato fresco e successiva digestione con enzimi di restrizione EcoRI e XbaI e i frammenti ottenuti, della lunghezza di 1, 3 e 6 kb comprendenti tutta la molecola, sono stati clonati e digeriti con enzimi di restrizione specifici e successivamente sequenziati fino ad ottenere la completa sequenza del genoma mitocondriale.

La lunghezza del DNA mitocondriale della pecora è di circa 16.616 paia di basi (bp), anche se questo valore non è assoluto, perché si possono verificare differenti ripetizioni in tandem della lunghezza di 75 bp o inserzioni e delezioni di singole basi (ripetizioni in tandem: uno o più nucleotidi sono ripetuti, e ogni ripetizione è adiacente alle altre; es: ATTCGATTCGATTCG).

La composizione del filamento leggero è 33, 7% adenina (A), 25, 8% citosina (C), 13, 1% guanina (G) e 24, 7% timina (T).

La regione di controllo della pecora è composta in prevalenza da Adenina e Timina, che costituiscono il 63% delle basi presenti in questa porzione di DNA lunga circa 1180 basi, che è molto più lunga delle corrispondenti regioni degli altri mammiferi.

Rispetto agli altri vertebrati questa regione presenta delle caratteristiche diverse: è stato identificato solo uno dei tre CBS (blocchi di sequenze conservate), il CBS1, mancando infatti il CBS2 e il CBS3; ed è presente un

lungo tratto di polipirimidine di 22 nucleotidi localizzato tra il CSB1 ed il gene codificante per rRNA-Phe, dove si ritrova di solito il CBS2.

Situazioni di questo tipo si ritrovano nei bovini, dove la sequenza più paragonabile al CBS2 è costituita da 12 citosine consecutive prima del gene per tRNA-Phe e non è presente il CBS3 (King & Low 1987).

Nei cetacei, è una caratteristica comune un tratto di 15 - 18 polipirimidine e l'assenza del CSB-3 (Dillon & Wright 1993) e ciò suggerisce che questo tratto polipirimidinico sia una proprietà caratteristica degli artiodattili.

Nel dominio destro del D - loop della pecora, è stata individuata una ripetizione diretta di 22 pb su 29, che includono la maggior parte del tratto polipirimidinico.

Nel dominio sinistro, invece, sono stati trovati due strutture particolari: nella primaria un insolito alto numero (10) di segnali associati alla terminazione prematura della replicazione (TAS) del filamento pesante (Doda *et al.* 1981) e nella secondaria, un altro TAS e una sequenza pentanucleotidica conservata, ritrovata anche negli atri vertebrati (Saccone *et al.* 1993). Inoltre sempre nella parte sinistra sono state ritrovate altre quattro tandem repeats di 74 pb, vicino al gene per l'rRNA - Pro. L'origine delle sequenze ripetute nel DNA mitocondriale non è stato ancora ben capito, in ogni modo è comunemente spiegato come il risultato di eventi di *slip - replication* e di fenomeni di ricombinazione non omologhi (Buroker *et al.* 1990).

È da notare che tutte le ripetizioni sono localizzate all'inizio o alla fine della struttura iniziale del D - loop, e condividono la capacità di generare strutture secondarie stabili.

❖ **Dna Mitochondriale e Filogenesi**

La filogenia, (dal greco φιλεῖν amare e Γένεσις "nascita", "creazione", "origine") è lo studio dell'evoluzione della vita. È uno strumento fondamentale della sistematica che si occupa di ricostruire le relazioni di parentela evolutiva, di gruppi tassonomici di organismi a qualunque livello sistematico.

La filogenetica studia l'origine e l'evoluzione di un insieme di organismi, solitamente di una specie. Un compito essenziale della sistematica è di determinare le relazioni ancestrali fra specie note (vive ed estinte).

Per facilitare la comprensione dell'origine delle specie allevate un marker molecolare ideale deve avere alcune caratteristiche:

- dovrebbe essere evolutivamente conservato per permettere l'identificazione del *taxon* selvatico o della popolazione da cui la specie discende;
- il marker deve essere variabile e scelto in modo da coprire le zone in cui si cerca di identificare le località in cui possa essere avvenuta la domesticazione;
- il marker deve evolvere con un tasso di variabilità elevato seppure costante.

Nel corso del tempo anche gli studi filogenetici sono stati perfezionati, passando da quella che era definita chemio-tassonomia, cioè l'analisi di proteine, enzimi e carboidrati attraverso l'uso della cromatografia, a tecniche di sequenziamento del DNA nucleare e del DNA mitocondriale.

Soprattutto quest'ultimo, grazie alla sua ereditabilità materna e alle sue caratteristiche che corrispondono a quelle del *marker* ideale, rappresenta un valido mezzo d'indagine.

Coalescenza

Una delle più avanzate teorie proposte in genetica delle popolazioni è la coalescenza, in cui le origini dei geni sono tracciate indietro nel tempo fino al punto in cui è presente un antenato comune.

Il più recente antenato comune (*most recent common ancestor*, MCRA) è l'ultima copia di alleli individuali che può essere definita come quella che ha dato origine alle successive copie nella popolazione.

Le relazioni di eredità tra alleli sono tipicamente rappresentate come “*gene genealogies*” molto simili a degli alberi filogenetici.

In filogenetica un gruppo tassonomico è definito monofiletico se è composto da un antenato conosciuto e tutti i suoi discendenti, polifiletico se comprende tutti i discendenti, ma non l'antenato e parafiletico se comprende alcuni, ma non tutti i discendenti del MRCA.

Nei casi più semplici la teoria della coalescenza assume che non ci sia ricombinazione, selezione naturale e flusso genetico tra le popolazioni, anche se nuove proposte, oltre ad includere la ricombinazione e la selezione, tengono conto dei modelli evolutivi e demografici.

Introgressione

Le *gene genealogies* possono differire dal tipico schema delle specie per molte ragioni, infatti i geni hanno una storia determinata da mutazione e selezione, e soprattutto questa porta a grosse differenze tra gene e gene all'interno della stessa popolazione.

Un particolare problema è la possibilità di introgressione da una specie all'altra. Questa non è altro che il passaggio di un pool genico da una specie ad un'altra attraverso l'incrocio di ritorno tra un ibrido interspecifico e uno dei suoi parenti.

A causa di questo fenomeno si può conoscere la storia recente di una specie ma non le parti precedenti.

L'introggressione del DNA mitocondriale può avvenire con più probabilità rispetto al DNA nucleare ed è difficile distinguere tra una situazione dovuta dall'introggressione da una dovuta all'incompleta suddivisione dei pedigree.

Ci sono molti esempi d'introggressione mitocondriale non accompagnata da apparente introggressione nucleare.

In molti casi il DNA mitocondriale di un taxon rimpiazza totalmente quello di un altro, senza alcuna evidenza d'introggressione nucleare o segnali morfologici.

L'introggressione mitocondriale avviene principalmente per due motivi:

selezione: la fissazione selettiva di un allele in una popolazione può avvenire anche in una seconda, soprattutto quando le due popolazioni occupano un habitat diverso da quello del loro antenato comune. Qualunque adattamento locale del DNA mitocondriale faciliterebbe l'introggressione attraverso la selezione diretta. A causa del basso grado di *linkage* tra DNA mitocondriale e DNA nucleare non si verifica l'*hybrid breakdown*, cioè la scomparsa di quegli ibridi non adattati all'ambiente, come in realtà si verifica nel caso di selezione sui geni nucleari. Come risultato il DNA mitocondriale è più soggetto a introggressione di quello nucleare.

deriva genetica: la deriva genetica può permettere la fissazione di alcuni alleli deleteri all'interno di una popolazione, questa avrà una *fitness* minore rispetto alle popolazioni della stessa area e per successiva selezione si potrà avere l'introggressione di DNA mitocondriale dalla popolazione più adattata a quella meno adattata.

❖ **Lo studio del DNA mitocondriale nella pecora domestica**

Anche per quanto riguarda gli ovini moderni sono stati eseguiti studi filogenetici al fine di definirne le origini.

Molte specie o sub specie di ovini selvatici sono state proposte come antenati della pecora domestica (Ryder 1984) o viene ritenuto che abbiano contribuito alla formazione delle attuali razze. Rispetto agli studi effettuati sulle origini dei

bovini (Loftus *et al.* 1994), suini (Giuffra *et al.* 2000), equini (Vila *et al.* 2001) e caprini (Luikart *et al.* 2001), il cui numero di progenitori è limitato, per quanto riguarda la specie ovina esiste un gran varietà di specie e di sottospecie di possibili antenati.

Molte specie di ovini selvatici sono state proposte come progenitrici delle specie attuali, anche se la loro classificazione tassonomica è molto confusa e controversa; per questo sono state intraprese diverse vie di indagine basate su dati morfologici, sul cariotipo, sulla distribuzione geografica e sull'analisi del DNA mitocondriale.

Tra tutte queste ricerche quelle che si sono basate sul DNA mitocondriale hanno portato alla suddivisione degli ovini in aplogruppi specifici e differenti tra di loro.

Partendo dagli studi di Hiendleder e colleghi (Hiendleder *et al.* 1998b; 2002) con la suddivisione nei due aplogruppi asiatico (A) ed europeo (B), si è passati con Pedrosa *et al.* (2005) all'espansione ad un terzo gruppo, quello caucasico (C), e nel 2006 la classificazione è stata ampliata con altri due aplogruppi D ed E. (Meadows *et al.* 2006; Tapio *et al.* 2006).

Hiendleder nel 1998 ha confrontato i due aplogruppi A e B con alcune razze selvatiche in modo da poterne definire le relazioni, soprattutto sono stati presi in considerazione il muflone (*Ovis musimon e orientalis*), l'urial (*O. vignei*) e l'argali (*O. ammon*).

Per quanto riguarda l'aplogruppo B, predominante nelle razze europee, è stato collegato filogeneticamente con il muflone europeo (*Ovis musimon*), mentre per l'aplogruppo asiatico non sono state evidenziate relazioni con nessuno degli ovini selvatici considerati.

Questo sembra sia causato dal limitato numero di razze e di individui utilizzato per le ricerche e perché le strategie selettive, diverse da quelle attuali, potrebbero aver preservato un retaggio genetico che potrebbe fornire dati non utilizzabili per definire l'origine della pecora moderna.

Pedrosa *et al.* (2005), basandosi sugli studi compiuti su una razza turca, sono arrivati alla conclusione che la variabilità del DNA mitocondriale negli ovini è molto più grande di quello che si pensava.

Anche per quanto concerne l'aplogruppo C non è stata evidenziata nessuna relazione con le sequenze dell'Argali e dell'Urial, che è suddivisa in due tipi distinti (*O. vignei arkal* e *O. vignei bochariensis*).

Sempre Pedrosa et al. hanno dimostrato le differenze tra i tre aplogruppi negli alberi filogenetici ottenuti partendo dalle sequenze del citocromo - b rispetto a quelle del D-loop.

Successivamente, Tapio *et al.* (2006), hanno posto in evidenza la presenza di un quarto aplogruppo D, nonostante ci fosse l'idea che fosse uno pseudogene nucleare (numt), visto che fu osservato solo in un tipo di pecora caucasica.

Anche l'aplogruppo E (Meadows *et al.*, 2006) era ritenuto un numt, invece, utilizzando anche in questo caso le sequenze di citocromo - b, è stata verificata l'ipotesi che si trattasse di un gruppo distinto.

In conclusione, anche se l'aplogruppo europeo può essere messo in relazione con il muflone (*O. musimon*), questa relazione non è assoluta in quanto, da alcuni studi (Tapio *et al.*, 2006,) è emerso che lo stesso muflone potrebbe essere il frutto di un inselvaticamento di una razza che veniva allevata, unita ad incroci con altre specie selvatiche; infatti, nonostante la differenza nel numero di cromosomi molte specie del genere *ovis* possono dare luogo ad ibridi fertili.

Inoltre esistono altri problemi come dell'introggressione, cioè il passaggio di materiale genetico da una popolazione ad un'altra, che può influenzare negativamente le analisi e i problemi connessi con la linea maschile, visto che gli studi che utilizzano il DNA mitocondriale si riferiscono solo a linee materne, e questo metodo di indagine, anche se altamente informativo, non chiarisce totalmente i dubbi relativi all'origine delle razze moderne.

Lo scopo del presente lavoro è stato lo studio della variabilità genetica e della struttura di popolazione delle principali razze di derivazione merino allevate in Europa.

Più precisamente si sono affrontati due tipi di studio. Il primo ha riguardato una tipizzazione genetica tramite marcatori microsatelliti (STR) delle razze: Merino Spagnola, Merinos Fleischaf e Precoce (Spagna); Merino di Beira Baixa, Merino Branco e Merino Preto (Portogallo); Merinos Rambouillet, Merinos D'Arles e Merinos Est-a-laine (Francia); Polsky Merinos (Polonia) e Merinizzata Italiana, Gentile di Puglia e Sopravissana (Italia).

Si sono determinati in questa prima parte i principali parametri statistici per determinare l'equilibrio e la biodiversità delle razze in studio e in seguito la loro struttura genetica, con particolare attenzione alla capacità dei marcatori di essere impiegati in studi di assegnazione d'individui o indagini di parentela.

Infine si è condotta un'indagine a livello del DNA mitocondriale (sito ipervariabile della regione di controllo o d-loop) ai fini di determinare se esistevano differenze apprezzabili per via materna all'interno del ceppo merino e le relazioni con i principali aplogruppi riscontrati dagli altri autori nel panorama delle razze euroasiatiche.

MATERIALI E METODI

STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ TRAMITE MARCATORI MICROSATELLITI.

❖ **Campionamento**

Per il presente studio sono state prese in considerazione alcune tra le più indicative razze di origine merino allevate in Europa. Tra queste sono presenti sia razze di diretta discendenza dal Merino, in altre parole che si sono originate da esso per selezione (Merinos Rambouillet o il Merinos) e razze che sono state costituite utilizzando una o più razze Merinos come incrociante su razze di tipo differente ai fini di migliorarne le produzioni (ad esempio l'incrocio tra l'Appenninica e la Merinos per migliorare la produzione laniera dello stato Pontificio). In ultima analisi sono state incluse alcune razze, di riferimento nelle analisi statistiche, caratterizzate per non avere avuto, almeno in tempi recenti un'evoluzione comune al Merino: la razza Appenninica (Italia) e il Segureño (Spagna).

Razza	Origine	N	Abbreviazione
Sopravissana	Italia	44	SOP
Gentile di Puglia	Italia	30	GEP
Merinizzata Italiana	Italia	30	MEI
Merino Spagnolo	Spagna	40	MES
Merinos Precoce	Spagna*	30	MPZ
Merinos Fleischaf	Spagna*	30	FLC
Merinos Rambouillet	Francia	30	RAM
Merinos D'Arles	Francia	30	MDA
Merinos Est-a-Laine	Francia	30	MEL
Merino da Beira Baixa	Portogallo	30	MBX
Merino Branco	Portogallo	30	MBA
Merino Preto	Portogallo	30	MPP
Merino Polski	Polonia	30	POL
Appenninica	Italia	30	APP
Segureño	Spagna	30	SEG

Tabella 4: razze utilizzate nello studio e rispettiva origine geografica, numero d'individui e abbreviazione.* Il M. Precoce (razza francese) e il M. Fleischaf (razza tedesca) sono oggi allevati in gran numero in Spagna mentre sono diventate rare nei paesi di origine.

Il campionamento come le successive analisi di laboratorio hanno coinvolto quattro strutture di ricerca in diversi paesi Europei:

- laboratorio di “Genetica Molecular Aplicada”, Universidad de Cordoba (Spagna);
- laboratorio di “Biotecnologie Avanzate” Università degli Studi di Perugia (Italia);
- laboratorio di “Genetica Molecular” Estação Zootecnica Nacional – Vale de Santarem (Portogallo);
- laboratorio LABOGENA (Jouy en Josas - Cedex), tramite INRA Toluose (Francia).

Si è proceduto al reperimento di 30 campioni di ciascuna razza tra soggetti di sesso femminile e maschile. Si è avuto cura di includere il più alto numero possibile di allevamenti (>5) per ogni razza, al fine di coprire un esteso areale geografico. Il materiale biologico per l'estrazione del DNA è stato in tutti i casi sangue periferico, prelevato per mezzo di provette *vacutainer*, contenenti EDTA (acido Etilendiamminotetracetico) come anticoagulante, dalla vena giugulare a livello della regione del collo e mantenuto a 4° C o -20° C fino alla successiva estrazione.

❖ **Estrazione e conservazione del DNA**

Il DNA totale delle razze citate è stato ottenuto mediante kit GenElute Blood Genomic DNA (Sigma Aldrich). Questo kit permette l'ottenimento di una buona quantità di DNA da esigui ammontare di campione biologico, anche se il materiale ottenuto non presenta in termini di purezza e qualità intrinseca dei valori ottimali. Inoltre non prevede l'uso di reagenti nocivi, permettendo l'uso del protocollo anche in laboratori non attrezzati.

Qui di seguito è presentato il procedimento di estrazione:

200 µl di sangue intero insieme a 20 µl di Proteinasi *K* sono inseriti in un'Eppendorf da 1,5 ml ed il tutto è vortexato accuratamente. Sono aggiunti 20 µl di RNAasi prima di vortexare di nuovo ed incubare per 2 minuti a

temperatura ambiente. 200 μ l di soluzione di lisi sono addizionati al campione ed il tutto viene incubato a 55°C per 10 minuti. Sono quindi aggiunti 200 μ l di etanolo (95-100%) al lisato e si vortexa. Si trasferisce l'intero contenuto dell'Eppendorf in una colonna mini-prep da estrazione completa del tubo da 2 ml (colonna questa che è caratteristica del kit da estrazione) in precedenza attivata con la soluzione di preparazione delle colonnine. Si centrifuga quindi a 8300 r.p.m. (*revolutions per minute*) per 1 minuto e si pone poi la colonnina in un nuovo tubo da 2 ml. Si aggiungono 500 μ l di soluzione di pre-lavaggio all'interno della colonnina e si centrifuga a 8300 r.p.m. per un minuto; la colonnina viene poi posta in un nuovo tubo da 2 ml. Si aggiungono 500 μ l di soluzione di lavaggio alla colonnina e si centrifuga per 3 minuti a 13000 r.p.m. Si scarica poi il prodotto della centrifugata, si ripone la colonnina nello stesso tubo e si ripete la centrifugazione per 1 minuto a 13000 r.p.m. Si pone la colonnina in un nuovo tubo da 2 ml. Si pipettano 100 μ l di soluzione di eluizione al centro della membrana all'interno della colonnina, si lascia in incubazione per 5 minuti e poi si centrifuga per 1 minuto a 8300 r.p.m. Questa operazione si esegue 2 volte. Alla fine si getta la colonnina e si stocca il DNA ottenuto.

Tutti i campioni di DNA sono stati oggetto di analisi quantitativa mediante spettrofotometro e qualitativa mediante elettroforesi in gel di agarosio.

In seguito tutti i campioni sono stati diluiti per una concentrazione finale di 20ng/ μ l di DNA totali e conservati a -20°C per il successivo utilizzo.

❖ ***Disegno del panel di microsatelliti***

Inizialmente il presente progetto comprendeva un totale di 38 marcatori che formavano un set di microsatelliti in comune tra i laboratori dell'Università di Perugia Cordoba e Lisbona nell'ambito dell'idea originaria di questa tesi di dottorato che si prefiggeva lo studio molecolare di alcune razze Merino Europee. In seguito si sono aggiunte le razze Francesi, ma solo per 18 marcatori, contrassegnati dall'apice **a**.

Marker	Posizione genomica		Riferimento	Range (bp)	Accession number
	Cromosoma	cM			
*: relativo alla mappa di linkage bovina (non mappati in <i>Ovis aries</i>)					
BM1824 ^a	1	286,5	3	180-192	G18394
BM6506	1	228,0	3	192-208	G18455
INRA006	1	135,7	6	116-141	X63795
OarFCB11	2	315,2	8	121-143	L01531
OarFCB20 ^a	2	195,4	8	92-112	L20004
OarCP34 ^a	3	31,2	18	112-126	U15699
INRA23	3*	35-35,5	6	209-229	X67830
McM527 ^a	5	127,4	12	165-175	L34277
D5S2	5*	121,8	6	190-210	Z14040
ETH10	5*	71,76	16	208-208	Z22739
RM006	5	27,8	17	119-130	U32911
OarAE129 ^a	5	117,5	19	133-159	L11051
McM140	6	95,9	12	167-193	L38979
ILST005 ^a	7	134,4	13	181-216	L23481
ETH225	9	9,4	7	136-156	Z14043
CSSM66	9	24,2	1	180-202	AAFC03025817
ILSTS11 ^a	9	40,1	13	268-282	L23485
OarFCB193 ^a	11	66,6	8	96-136	L01533
INRA35	12	94,6	15	120-140	X68049
TGLA53 ^a	12	39,1	14	121-147	NW_001493400
CRSD247 ^a	14*	25,5	5	218-244	-
INRA63 ^a	14	64,1	6	165-199	X71507
SPS115	15	34,8	4	185-205	X16451
MAF65 ^a	15	46,5	2	123-135	M67437
TGLA126	16	34,3	14	110-240	-
MAF214 ^a	16	44,8	9	182-230	M88160
MAF209 ^a	17	49,4	9	109-135	M80358
BM8125 ^a	17	88,1	3	116-122	G18475
OarCP49	17	29,9	18	85-107	U15702
OarFCB48	17	40,3	8	143-167	M82875
TGLA122	18	88,7	14	133-153	-
OarFCB304 ^a	19	64,6	8	150-188	L01535
HSC ^a	20	56,7	11	268-300	M90759
BM1818	20	69,5	3	258-284	G18391
OarCP20	21	23,5	18	71-87	U15695
OarJMP29 ^a	24	4,0	21	96-150	U30893
OarVH72	25	43,9	20	121-135	L12548
BM6526	26	16,4	3	161-175	G18454

Tabella 5: Alcune caratteristiche dei marcatori utilizzati e relativo riferimento bibliografico. 1, Moore et al. (1997); Buchanan et al. (Buchanan et al. 1991); 3, Bishop et al. (Bishop et al. 1994); 4, Moore & Byrne (Moore & Byrne 1993); 5, Davies et al. (Davies et al. 1996); 6, Vaiman et al. (Vaiman et al. 1994); 7, Steffen et al. (Steffen et al. 1993); 8 e 9 Buchanan & Crawford (1992; 1993); 10, Ihara et al. (Ihara et al. 2004); 11, Blattman et al. (Blattman & Beh 1992); 12, Hulme et al. (Hulme et al. 1994); 13, (Brezinsky et al. 1993); 14, Geroger & Massey (Georges & Massey 1992); 15, De Gortari et al. (De Gortari et al. 1997); 16, Solinas Toldo et al. (Solinas Toldo et al. 1993); 17, Kossarek et al. (Kossarek et al. 1993); 18, Ede et al. (Ede et al. 1995); 19, Penty et al. (Penty et al. 1993); 20, Pierson et al. (Pierson et al. 1993); 21, Broom et al. (Broom et al. 1996).

L'insieme dei marcatori (tabella 5) è stato selezionato in base alle direttive internazionali per lo studio della diversità animale (ISAG; FAO 2004a, b). Si è verificato inoltre la relativa posizione di mappa tramite il database on line (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9940). Ciò è stato possibile grazie alla pubblicazione della nuova mappa di linkage per la specie ovina, SM 4,7 (Sheep map version 4,7) da Maddox *et al.* (2001).

Reazione Multiplex	Loci	"Gel"*	T. di appaiamento °C
M 1	CSSM66 ILSTS11 MAF65 BM1824 SPS115	I	55
M 2	BM8125 TGLA122 CRSD247 BM1818 INRA006	I	55
M 3	INRA35 BM6506 ETH10 INRA63 ETH225	II	55
M 4	BM6526 RM006 OarCP34	III	55
M 5	OarFCB304 OarCP20	III	60
M 6	MAF209 D5S2 OarFCB48	IV	55
M 7	HSC McM527 MAF214 OarFCB20	IV	60
M 8	TGLA53 TGLA126	II	55
M 9	OarFCB11	IV	60
M10	OarVH72 OarJMP29 McM140	V	61°
M11	OarFCB193 ILST005 OarAE129	VI	58°
M12	INRA23 OarCP49	VII	58°

Tabella 6: Caratteristiche delle reazioni multiplex e dell'elettroforesi.

Le diverse paia di primer (forward e reverse) utilizzate nella reazione di PCR sono state reperite da diverse fonti (FAO, ISAG, <http://rubens.its.unimelb.edu.au/~jillm/jill.htm>); Le temperature di melting e eventuali problemi legati alla sequenza (formazione di strutture secondarie, difficoltà di denaturazione) sono state testati tramite il software Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000).

❖ ***Amplificazione delle sequenze ed Elettroforesi***

L'amplificazione è stata effettuata tramite una serie di reazioni multiplex di PCR (Polymerase Chain Reaction), metodo hot start (utilizzando la Taq DNA Polimerasi "Hot Start" Sigma Aldrich), condotte tramite termociclatore Biometra TGradient 96. Le condizioni di amplificazione prevedevano il ciclo seguente: 5' a 95°C + 35 cicli (30" a 95°C denaturazione; 45" alla temperatura di ibridazione; 30" a 72°C estensione) ed un ciclo finale di 15 minuti a 72°C.

La miscela di reazione era così composta:

Componente	quantità
DNA 20 ng/ μ l	2 μ l
PCR Buffer 10X	1,2 (1X finale)
MgCl	1 μ l (2,5 mM)
Primer 10 μ M each	0,2 pmol of each
DNTPs 10 mM	0,25 μ l (200 uM of each)
Taq 2,5U/ μ l	0,20 μ l (0,05U/ μ l)
H ₂ O	A completamento
Volume	10 μ l

Tabella 7: Miscela base della reazione di PCR

Ogni coppia di primer presentava nell'estremità 5' (5 end labelling techniques) dell'oligonucleotide forward, una molecola detta fluorocromo necessaria per la successiva elettroforesi capillare. Si tratta in definitiva di particolari sostanze che se eccitate dalla luce laser del sequenziatore, emettono una fluorescenza di

diverse lunghezze d'onda secondo la molecola utilizzata, che sono poi visualizzate come colori differenti. Questo ha permesso l'elettroforesi contemporanea di frammenti di DNA di uguale range di lunghezza. Infatti, le differenti reazioni multiplex sono state poi miscelate in un procedimento che viene detto *pooling* secondo lo schema in tabella 6.

Nel nostro caso si sono utilizzati i fluorocromi FAM, HEX, NED e ROX con un filtro di lettura D (modalità di lettura della telecamera di acquisizione), che restituisce rispettivamente i colori Azzurro, Verde, Giallo e Rosso. Il Fluorocromo ROX (rosso) è stato utilizzato per marcare lo standard di peso molecolare Genescan HD 400, caratterizzato da diversi frammenti fino a 400 pb di lunghezza.

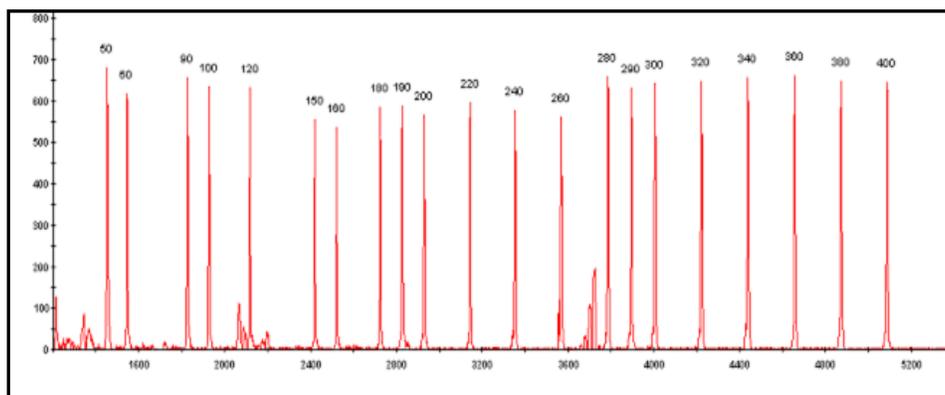


Figura 32: Picchi elettroforetici dello standard di peso molecolare Genescan rox 400HD.

Le piastre con i campioni di ciascuna miscela di campioni venivano preparate nel seguente modo: 1 μ l di un campione diluito con acqua in ragione del rapporto 1:2 addizionato di 11 μ l di Highly Deionised Formamide (Formamide Hi-Di) e a 0,23 μ l dello standard di peso molecolare Genescan 400-ROX HD.

I campioni venivano denaturati a 95°C per 5 minuti, passati in bagno di ghiaccio e quindi venivano caricati nell'autocampionatore del 3130xl Genetic Analyzer per essere sottoposti ad elettroforesi capillare automatica.

Successivamente, terminata la corsa elettroforetica, si è proceduto all'analisi dei risultati tramite il software GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems) per individuare gli alleli riscontrati ai diversi loci microsatelliti.

Come accennato nella parte introduttiva riguardante gli errori di genotipaggio, il fatto di utilizzare diversi apparati elettroforetici può apportare un certo grado di variabilità nella lettura dei risultati a causa del variare delle condizioni di temperatura (Davison & Chiba 2003) del laboratorio, o per semplici fattori legati alla manualità dell'operatore.

Ne deriva che a parità di genotipo, differenti apparati possono restituire una lettura completamente differente. Per ovviare a ciò si è proceduto ad una procedura di standardizzazione delle macro di lettura del software di genotipaggio (Genemapper o Genotyper). Il processo consiste nell'Analizzare un certo numero di campioni noti in tutti i laboratori coinvolti nell'analisi ed assegnare ad essi un genotipo scelto in maniera univoca. A livello internazionale viene periodicamente effettuato dalla ISAG (Internati Society of Animal Genetics) un controllo di questo tipo per uniformare i risultati dei differenti centri di ricerca e viene comunemente detto *comparition test* (<http://www.isag.org.uk/journal/comparisonguide.asp>).

CAMPIONE	RAZZA
C1	Merinos polacco
C2	Merinos polacco
C3	Merinos polacco
C4	Merinos polacco
C5	Gentile di Puglia
C6	Gentile di Puglia
C7	Comisana
C8	Comisana

Tabella 8: campioni utilizzati nella procedura di standardizzazione.

❖ ***Analisi statistica dei dati.***

Tutti i dati genotipici sotto forma di genotipo nel formato rounded base pair si sono esportati dal software GeneMapper versione 4.0 in un file MS Excel versione 2007 (microsoft) creando una colonna per ogni aplotipo di ogni

campione, per ogni marcatore. Tramite il software The Excel microsatellite Toolkit (Park 2001) si è proceduto alla costruzione del file di input per il software Genepop (formato 3 digit) che il più utilizzato dai più importanti pacchetti statistici (Excoffier & Heckel 2006). I successivi file di input per i successivi programmi si sono costruiti tramite il software Convert versione 1.31 (Glaubitz 2004).

Si è proceduto inizialmente al calcolo delle frequenze alleliche e genotipiche per ogni locus in ogni popolazione e si è inoltre effettuata la prova dell'equilibrio di Hardy-Weinberg secondo il metodo di Guo e Thompson (Guo & Thompson 1992b) utilizzando l'algoritmo delle Catene di Montecarlo Markov implementato nel software Genepop versione 4.0 (Rousset 2008).

Tramite conta diretta si è determinato il numero di alleli privati per ogni popolazione e per marcatore.

Con il software Genetix versione 4.05.02 (Belkhir *et al.* 2003) si sono determinati i valori di eterozigosità attesa e osservata (H_e e H_o), il valore di F_{is} per popolazione con rispettivo intervallo di confidenza (1000 bootstraps) e gli F statistici secondo la variante di Weir & Chocerman per marcatore (Weir & Cockerham 1984).

Con il software PopGENE versione 1.3.1 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh>) si è calcolato il numero di alleli e il numero effettivo di alleli.

Tramite il software Cervus versione 3.0.3 (Marshall *et al.* 1998) si è calcolato la probabilità di non esclusione (1-PE) nel caso di esclusione di un genitore candidato, di un genitore candidato dato il genotipo dell'altro genitore, di identità tra due individui non relazionati e tra due fratelli. Tramite lo stesso pacchetto si è calcolato in oltre la frequenza stimata degli alleli nulli.

Per lo studio preliminare della relazione tra le popolazioni si è proceduto al calcolo delle matrici delle distanze genetiche secondo differenti algoritmi statistici tramite il software Populations 1.2.28 (Langella 1999) visualizzate con il metodo Neighbor-Joining o UPGMA (Saitou & Nei 1987) nel software TreeView 1.6.6 (Page 1996)

L'analisi di assegnazione a gruppi di individui tramite l'algoritmo delle catene di Montecarlo Markov è stata condotta Structure versione 2.2.3 (Pritchard y

col., 2000) ammettendo l'equilibrio di HW tra le razze e l'esistenza di frequenze genetiche correlate (Falush *et al.* 2003). Si è testata l'affidabilità statistica dell'elaborazione settando un burning period di 50.000 ripetizioni e 500.000 "run" imponendo al programma di suddividere il campione in un numero di K uguale al numero di razze studiate.

Il numero più probabile di cluster è stato stabilito secondo la procedura suggerita dall'autore, plottando il valore medio del logaritmo della distribuzione a posteriori e individuando il punto di flesso (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003).

Una tabella contenente un rank numerico secondo le caratteristiche di polimorfismo e probabilità di non esclusione per ogni marcatore nel campione totale, è stata costruita tramite un foglio di calcolo MS Excel versione 2007 (microsoft). In conformità a questo rank sono state condotte ulteriori analisi tramite il software Structure con 10, 15 e 33 marcatori (vedi discussione dei risultati) per testare l'efficacia dei marcatori scelti negli studi di assegnazione di individui ad una razza, di tracciabilità e paternità.

STUDIO DEL DNA MITOCONDRIALE

❖ **Disegno dei primer**

Per lo studio della variabilità a livello del DNA mitocondriale di alcune razze di derivazione Merino Europee si è studiata la regione di controllo del DNA mitocondriale (Cr - mtDNA) che è circondata dai geni che codificano per il RNA di trasferimento degli amminoacidi Prolina e Fenilalanina e è lunga circa 1200 nucleotidi e si posiziona.

E' una regione molto utile dal punto di vista filogenetico per la grande variabilità che presenta soprattutto nella regione centrale (D-loop), ma per la stessa ragione è difficile incontrare un sito nella sequenza abbastanza stabile,

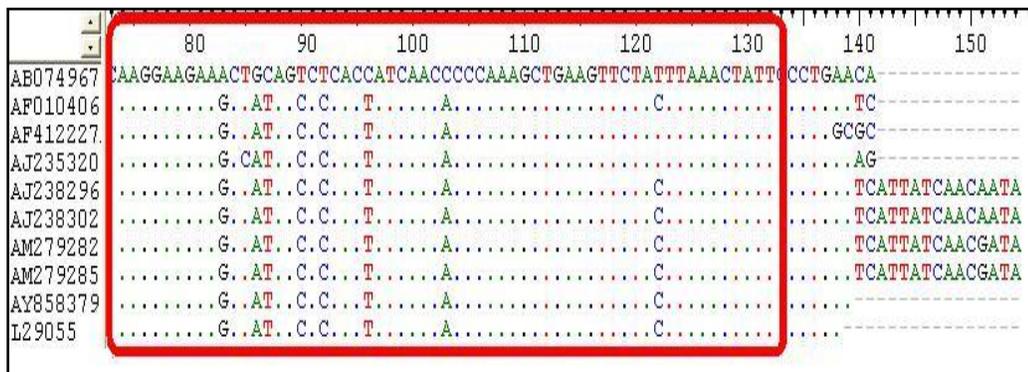


Figura 33: parte delle sequenze del gene tRNA-Pro allineate in diversi soggetti della famiglia dei Bovidi

per l'inserzione dei primer. Si è quindi deciso di scegliere, come sito di appaiamento dei primer due zone adiacenti alla regione di controllo che sono rispettivamente il gene che codifica per il RNA di trasferimento dell'amminoacido Prolina e quello per

l'amminoacido Fenilalanina che delimitano una sequenza di circa 1.200 bp che va in direzione 5'→3' dalla posizione 15.371 bp (inizio tRNA-PRO) alle 68 bp (fine tRNA-PHE).

SPECIE	NOME COMUNE	ACCESSION NUMBERS
<i>Ovis aries</i>	Ovino	AY858379 (Ha & Chung 2004)
<i>Ovis aries</i>	Ovino	AF010406 (Hiendleder <i>et al.</i> 1998a)
<i>Ovis aries</i>	Ovino	AM279285 (Fajardo <i>et al.</i> 2007)
<i>Ovis aries</i>	Ovino	AM279282 (Fajardo <i>et al.</i> 2007)
<i>Ovis aries</i>	ovino	L29055 (Zardoya <i>et al.</i> 1995)
<i>Ovis ammon</i>	Argali	AJ238302 (Wu <i>et al.</i> 2003)
<i>Ovis ammon</i>	Argali	AJ238296 (Wu <i>et al.</i> 2003)
<i>Alces alces</i>	Alce europeo	AF412227(Hundertmark <i>et al.</i> 2002)
<i>Gazella gazella</i>	Gazzella	AJ235320 (Douzery 1998)
<i>Bos Taurus</i>	Bovino	AB074967 (Mannen <i>et al.</i> 2001)

Tabella 9: caratteristiche delle sequenze utilizzate per il disegno dei primer.

Allo scopo di individuare un sito conservato in ambo le regioni si è proceduto ad allineare, tramite il programma ClustalW (Thompson *et al.* 1994), le sequenze dei geni tRNA-PRO e tRNA-Phe di differenti soggetti appartenenti alla famiglia dei bovidi (Figura 33) reperite in Genebank (tabella 9).

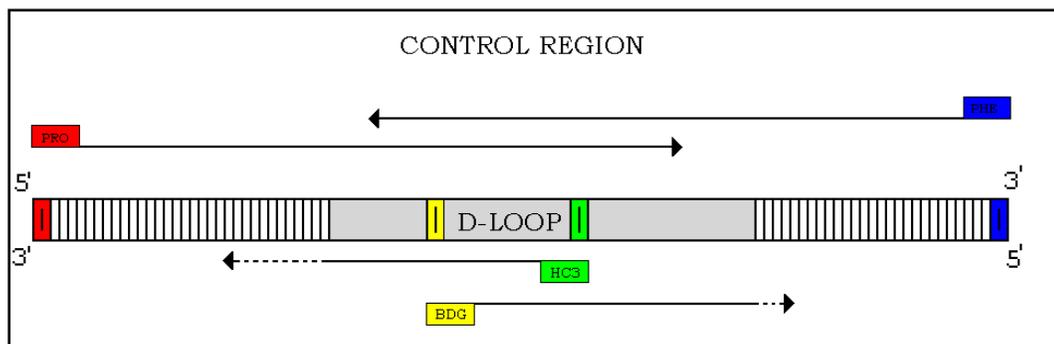


Figura 34: schema del sito di inserzione dei primer utilizzati per lo studio della sequenza.

Tramite il software Primer3 versione 0.4.0 (Rozen & Skaletsky 2000) si quindi individuato e ottimizzato la sequenza dei due primer che permettono di amplificare un frammento di circa 1200 bp contenente la regione di controllo (figura 34).

Allo stesso modo si è proceduto al disegno di un ulteriore coppia di primer, interni (*nested*) alla sequenza individuata dalla prima coppia per effettuare la successiva reazione di sequenziamento, disegnati su due domini conservati della regione ipervariabile (D-loop) al centro della regione di controllo (Pedrosa *et al.* 2005).

Tale accorgimento si è reso necessario per ridurre la zona da sequenziare da 1200 bp (lunghezza dell'intera sequenza amplificata) a circa 670 bp (lunghezza della regione ipervariabile interna alla regione di controllo).

Le sequenze ed alcune caratteristiche dei primer disegnati sono riportate in tabella 10:

PRIMER	DIREZIONE	Tm (°C)	bp	SEQUENZA 5'-3'
Ovis-Pro	<i>forward</i>	62,2	24	CACTATCAACACCCAAAGCTGAAG
Ovis-Phe	<i>reverse</i>	60,4	20	GCATTTTCAGTGCCTTGCTT
BDG	<i>forward</i>	58,0	26	CATCTGCTTCTTTCTTCAGGGCCATC
HC3	<i>reverse</i>	58,0	22	AGACGGCCATAGCTGAGTCCAG

Tabella 10: primer utilizzati per lo studio del DNA mitocondriale.

❖ **Studio della sequenza**

La reazione di amplificazione presentava un volume finale di 25 µl, costituito da 1 µl di DNA (50 ng) e 24 µl di miscela di PCR composta da buffer di PCR (1X), Cloruro di Magnesio (2,5 mM), DNTPs (0,8 mM) primer forward e reverse (0,2 pmol) e DNA polimerasi “Biotools HotSplit DNA Polymerase” (1 U). Si è proceduto ad un programma di PCR standard che prevedeva 30 cicli con una temperatura di appaiamento di 57° C. La reazione di PCR è stata infine purificata con il kit commerciale *Magnesil Yellow*[®] di (Promega).

Per il sequenziamento è stato utilizzato un kit commerciale, BigDye[™] versione 3.1 (Applied Biosystem) secondo le quantità in tabella 11:

REAGENTE	QUANTITA' μ l
BigDye terminator	2
5X buffer	0,7
Primer 5 μ M (3,2pmoli) BDG o HC3	0,65
DNA	3-6
H2O ultra pura	a 12

Tabella 11: miscela della reazione di sequenziamento

Per ogni campione da analizzare sono state effettuate due reazioni di sequenziamento, in ognuna delle quali è stato impiegato uno dei due primer *nested*. Il ciclo termico impiegato è stato il seguente:

1. 10 minuti a 96° C
2. 25 cicli di (34sec a 95°C;15 sec a 58°C; 4 min a 60°C)

La reazione di sequenziamento è stata infine purificata con il kit commerciale Magnesil Green® (Promega). Un'aliquota della reazione (1,25 μ l) è stata colorata con una soluzione composta da formammide deionizzata e blu destrano in ragione di 5:1 ed infine denaturata a 95°C per 5 minuti.

L'elettroforesi è stata condotta in un sequenziatore automatico ABI PRISM 377 utilizzando cristalli di 48 cm (50 Pozzetti), con distanziatori da 0,2 mm, in un gel di poliacrilammide con una concentrazione del 6% (ReproGel™), avendo cura di lasciare un pozzetto di carica libero ad ogni campione, per evitare contaminazioni.

❖ ***Le razze studiate***

Nello studio si sono analizzati 20 campioni delle razze Sopravissana (SOP), Gentile di Puglia (GEN), Fleischaf (FLE) e Merinos Precoce (PRE) scelti aleatoriamente nel campione utilizzato per lo studio con i marcatori microsatellitici.

In aggiunta a queste quattro razze si sono incluse le sequenze di altre razze di derivazione Merino presenti in Genebank (www.ncbi.org), depositate da differenti autori. Le sequenze sono visibili on-line agli accession number:

1. DQ790890, DQ790891, DQ790939, DQ790937, DQ790938 ,DQ790909 DQ790910, DQ790911, DQ790912, DQ790916, DQ791145, DQ791151, DQ791182, DQ791149, DQ791150, DQ79022, DQ79023, DQ79025, DQ79027DQ79028, DQ791154, DQ791159, DQ791128, DQ791065 e DQ791063 (Pedrosa *et al.* 2005; Pedrosa *et al.* 2007) per le merino portoghesi Branco (MBB), Preto (MPR), di Beira Baixa (MBR) e il merino Spagnolo (MER);

2. AF010407,AF039578, (Hiendleder *et al.* 1998b) per il merino Landschaf (MEL) (Germania);

Si sono inoltre incluse le sequenze appartenenti ai maggiori aplogruppi (macrogruppi filogenetici) riscontrati da differenti autori (vedi introduzione), utilizzati come dati di comparazione:

3. AF242347, AY091489, e AF039579(Hiendleder *et al.* 1998b) per l'Urial (URI), L'Argali (ARG) e il muflone (MUF) (Asia Minore);

4. DQ097453, DQ097455, Q097456 e AF039577 (Hiendleder *et al.* 1998b; Pedrosa *et al.* 2005) per la Morkaraman (MOR) e la Karayaka (KAR) come esempio dell'aplogruppo A;

5. DQ097432, DQ097434, DQ097435, DQ097442, DQ791128, DQ791065, DQ791063 DQ791059 e DQ791054 (Pedrosa *et al.* 2005; Pedrosa *et al.* 2007) per le razze Karayaka (KAR), Hemsin (HEM), Tuj (TUJ), come esempio dell'aplogruppo B;
6. DQ097463, DQ097467, DQ097465, DQ097466 e DQ097464 (Pedrosa *et al.* 2005) per le razze Karayaka (KAR), Morkaraman (MOR), Akkaraman (AKA), Hemsinn (HEM) e Karayaka (KAR) come esempio dell'aplogruppo C;
7. DQ852288, DQ852289 (Meadows *et al.* 2006) per la razza Karayaka (KARD) come esempio dell'aplogruppo D;
8. DQ852280, DQ852281 (Meadows *et al.* 2006) per la razza Awassi (AWA) come esempio dell'aplogruppo E.

❖ **Analisi Statistica**

I dati di sequenza sono stati ricavati mediante il software Sequencing Analysis 3.1 di (Applied Biosystem) dal processamento dell'immagine digitale del gel. Tramite il software Mega 4.0 (Kumar *et al.* 1994) la sequenza di ogni campione è stata analizzata visivamente e confrontata con una sequenza di riferimento presente nel database *on line* (*accession number*: DQ791059) al fine di individuare eventuali errori nella lettura digitale.

Le sequenze ottenute sono state infine allineate tramite l'algoritmo ClustalW (Thompson *et al.* 1994) presente nel programma Mega.

Una prima analisi filogenetica sui risultati è stata condotta sempre utilizzando il software Mega 4.0 (Kumar *et al.*, 1994), attraverso il metodo Neighbour-Joining (Saitou & Nei 1987) ed utilizzando il modello di *p-distance* (Nei & Kumar 2000). Da queste analisi sono stati poi costruiti degli alberi filogenetici mediante *Bootstrapping* dei dati (1000 repliche) (Nei & Kumar 2000).

Tramite il software DNAsp versione 4.10.9 (Rozas & Rozas 1999) sono stati raggruppati gli aplotipi simili all'interno del campione, per il successivo calcolo

del numero di aplotipi, della diversità aplotipica, del numero di posizioni polimorfiche, del numero medio di differenze nucleotidiche e della diversità nucleotidica.

Un albero filogenetico a rete o network è stato costruito con il metodo Minimum Spanning Network attraverso il software Splitstree4 (<http://www.splitstree.org>) versione 4.0.1 (Huson & Bryant 2006).

Infine con il software Arlequin versione 3.1 (Excoffier et al. 2005) è stata calcolata l'A.MO.VA (Analysis of MOlecular VAriance) suddividendo il campione in diversi gruppi geografici e razziali. L'analisi molecolare della varianza, utilizzato in Arlequin (AMOVA) è essenzialmente analogo ad altri approcci basati su analisi della varianza delle frequenze geniche, ma tiene conto del numero di mutazioni tra aplotipi. Con la definizione di gruppi di popolazioni, l'utente definisce una particolare struttura genetica che sarà testato.

L'analisi gerarchica divide la varianza totale in componenti di covarianza secondo le differenze intra - individui, inter-individi, e inter - popolazionali (Weir 1996; Schneider *et al.* 2000). Le componenti della covarianza sono poi usati per calcolare gli indici di fissazione o F statistici (Wright 1951, 1965) usati poi per il test di significatività.

Per dati aplotipici assumiamo che i -esimo vettore delle frequenze aplotipiche delle j -esime popolazioni appartenenti a k -esimi gruppi, sia spiegato dall'equazione lineare:

$$X_{ijk} = x + a_k + b_{jk} + c_{ijk}$$

Gli effetti sono quindi a per i gruppi, b per le popolazioni e c per gli aplotipi (individui) nelle popolazioni dei gruppi, assumendo che siano additive, indipendenti e che abbiano associate le rispettive componenti della covarianza (σ^2_a , σ^2_b , σ^2_c). La varianza totale è data quindi dalla somma delle covarianze dovute alle differenze tra aplotipi nella popolazione (σ^2_c), dovute a differenze

degli aplotipi in differenti popolazioni nei gruppi (σ^2_b), e delle differenze tra i gruppi (σ^2_a).

Il calcolo si effettua secondo la seguente gerarchia (Excoffier et al. 1992), dove G è il numero di gruppi, P il totale delle popolazioni e N il numero totale di individui nei gruppi:

Fonte di variazione	Gradi di libertà	Devianza (SSD)	Varianza
Tra gruppi	$G - 1$	SSD(AG)	$n''\sigma_a^2 + n'''\sigma_b^2 + n'''\sigma_c^2$
Tra popolazioni/ nei gruppi	$P - G$	SSD(AP/ WG)	$n\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Tra popolazioni	$N - P$	SSD(WP)	σ_c^2
Totale	$N - 1$	SSD(T)	σ^2_T

Tabella 12: livelli gerarchici nel calcolo dell'Amova.

I parametri n e gli F statistici calcolo lati come:

$$S_G = \sum_{g \in G} \sum_{p \in g} \frac{2N_p^2}{N_g}$$

$$n = \frac{2N - S_G}{P - G}$$

$$n' = \frac{S_G - \sum_{p \in P} \frac{2N_p^2}{N}}{G - 1}$$

$$n'' = \frac{2N - \sum_{p \in G} \frac{2N_g^2}{N}}{G - 1}$$

dove G è il numero di gruppi nella struttura, P il numero di popolazioni, N il numero totale di individui, N_p il numero di individui nella popolazione p , N_g il numero di individui nel gruppo g .

Gli F statistici si ottengono invece:

$$F_{CT} = \frac{S_a^2}{S_T^2}$$

(test di permutazione su tutte le popolazioni nei gruppi)

$$F_{ST} = \frac{S_a^2 + S_b^2}{S_T^e}$$

(test di permutazione dei genotipi tra le popolazioni e tra I gruppi)

$$F_{SC} = \frac{S_b^2}{S_T^2}$$

(test di permutazione dei genotipi tra popolazioni nei gruppi)

RISULTATI E DISCUSSIONE

MARCATORI MICROSATELLITI

❖ **Diversità genetica**

Razza	N° individui	Loci tipizzati	He	Ho	N° Alleli	Fis
MES	40	38	0,72±0,02	0,67±0,01	7,97±2,65	0,079 (0,04 - 0,10)
SOP	44	38	0,74±0,02	0,60±0,01	8,61±2,93	0,060 (0,02 - 0,10)
MEI	30	38	0,76±0,02	0,71±0,01	8,55±3,02	0,064 (0,01 - 0,10)
MPZ	30	38	0,66±0,03	0,62±0,02	5,55±2,36	0,071 (0,00 - 0,09)
FLC	30	38	0,67±0,02	0,66±0,01	5,82±1,83	0,018 (-0,04 - 0,04)
GEP	30	37	0,73±0,02	0,69±0,01	7,68±2,57	0,058 (-0,01 - 0,08)
POL	30	38	0,75±0,02	0,70±0,01	8,11±3,12	0,070 (0,01 - 0,09)
RAM	30	18	0,53±0,04	0,54±0,02	3,00±0,97	-0,014 (-0,12 - 0,04)
MDA	30	18	0,76±0,02	0,71±0,02	7,94±2,62	0,068 (-0,01 - 0,10)
MEL	30	18	0,74±0,03	0,73±0,02	6,72±1,90	0,010 (-0,05 - 0,04)
SEG	30	26	0,73±0,03	0,67±0,02	7,54±2,61	0,085 (0,03 - 0,10)
APP	30	30	0,77±0,02	0,68±0,01	8,03±2,34	0,110 (0,04 - 0,12)
MPP	30	35	0,75±0,02	0,70±0,01	8,77±2,74	0,057 (0,00 - 0,07)
MBA	30	35	0,75±0,02	0,71±0,01	8,26±3,28	0,061 (0,01 - 0,07)
MBX	30	35	0,74±0,02	0,67±0,02	8,46±2,91	0,099 (0,04 - 0,12)
15	474	38	0,72±0,061	0,72±0,06	7,16±1,58	0,060 (0,04 - 0,09)

Tabella 13: numerosità del campione, loci tipizzati, eterozigosità attesa (He) e osservata (Ho), numero medio di alleli e coefficiente Fis ($p < 0.05$) calcolato con 1000 bootstraps.

Nella prima fase dell'analisi statistica sono stati determinati alcuni parametri generali sulle razze studiate che sono riportati in tabella 13.

Le razze sono state analizzate tramite 38 marcatori ad eccezione delle tre razze francesi derivanti da un dataset successivamente incluso nell'analisi, del Segureño, dell'Appenninica e le tre razze Portoghesi tipizzate rispettivamente con 26, 30 e 35 loci a causa di problemi di disponibilità economica.

Considerando le singole razze sulla totalità dei loci si è osservato un valore medio di 7,4 alleli, con un valore massimo di 8,77 nel Merino Spagnolo.

Risultati e discussione

Locus	No	Ne	He	Ho	Fis	Fit	Fst	PA
BM8125	10	3,26	0,67	0,66	-0,04	0,00	0,04	1
BM1818	16	8,20	0,83	0,86	0,04	0,10	0,07	2
BM1824	8	5,15	0,72	0,72	0,04	0,14	0,11	0
CSRD247	24	9,55	0,72	0,72	0,04	0,23	0,20	5
CSSM66	25	9,81	0,85	0,85	0,11	0,16	0,06	5
ILSTS11	12	7,14	0,76	0,76	0,05	0,16	0,12	2
INRA6	23	3,42	0,62	0,61	0,04	0,09	0,05	6
MAF65	9	3,82	0,72	0,72	0,01	0,04	0,03	0
SPS115	12	4,81	0,73	0,73	0,13	0,20	0,08	2
TGLA122	15	6,00	0,78	0,79	0,25	0,30	0,06	1
BM6506	12	4,35	0,72	0,71	0,03	0,11	0,08	1
ETH225	12	2,91	0,61	0,61	0,18	0,23	0,07	2
ETH10	5	1,36	0,19	0,20	0,46	0,65	0,34	1
INRA35	13	5,79	0,75	0,75	0,05	0,15	0,11	2
INRA63	23	6,55	0,77	0,77	0,00	0,08	0,09	5
TGLA126	17	9,16	0,86	0,86	0,15	0,18	0,04	3
TGLA53	15	6,01	0,79	0,78	0,06	0,11	0,05	3
BM6526	16	5,00	0,77	0,78	0,01	0,05	0,04	1
OarCP20	14	4,83	0,77	0,77	-0,01	0,04	0,05	5
OarCP34	13	4,97	0,74	0,73	0,04	0,13	0,09	5
OarFCB304	33	5,49	0,68	0,68	0,06	0,23	0,19	8
RM006	13	2,55	0,60	0,61	0,01	0,03	0,02	2
D5S2	14	4,00	0,69	0,69	0,08	0,16	0,09	6
HSC	19	9,14	0,85	0,85	0,03	0,07	0,05	3
MAF209	19	6,04	0,75	0,75	0,05	0,15	0,10	3
McM527	14	4,27	0,73	0,73	0,10	0,13	0,04	4
OarFCB11	16	6,13	0,79	0,78	0,02	0,09	0,06	2
OarFCB48	15	4,53	0,76	0,76	0,03	0,06	0,03	1
FCB20	16	5,77	0,79	0,79	0,03	0,07	0,05	1
MAF214	29	4,14	0,70	0,70	0,03	0,11	0,08	14
MCM140	12	5,35	0,79	0,79	0,02	0,05	0,03	0
OarCP49	26	8,60	0,86	0,86	0,04	0,07	0,03	7
INRA23	15	9,34	0,87	0,87	0,00	0,03	0,03	1
OarVH72	8	3,32	0,68	0,69	0,06	0,09	0,03	0
OarJMP29	28	6,27	0,78	0,78	0,04	0,11	0,07	10
ILST005	13	4,73	0,72	0,71	0,05	0,14	0,09	3
OarAE129	11	3,79	0,65	0,64	0,34	0,43	0,95	1
OarFCB193	14	2,28	0,45	0,44	0,04	0,26	0,22	4
Media e dv Intervallo di confidenza	16±6,3	5,47±2,16	0,72±0,12	0,68±0,14	0,06 (0,04-0,09)	0,13 (0,11-0,16)	0,10 (0,06-0,09)	3,21
Totale	609	207,83	-	-				122

Tabella 14: parametri di diversità genetica per ogni locus nel campione totale.

Preto e un valore minimo di 3 nella Merinos Rambouillet. Degno di nota il valore piuttosto basso riscontrato per la razza Merino Precoce di 5,5 alleli. Il valore medio di eterozigosità è risultato di 0,68 (tabella 14) per quella osservata (Ho) e di 0,72 per quella attesa (He) e quest'ultima ha mostrato un massimo di 0,77 nell'Appenninica e un minimo di 0,53 ancora nella Rambouillet.

I valori medi per razza di questi due parametri sono risultati non molto differenti, indice questo di un buon equilibrio delle razze studiate (accordo tra frequenze attese e osservate) soprattutto per la Merino Rambouillet (0,53 vs. 0,54).

Il valore di Fis è risultato non molto diverso da zero ed ha fatto osservare il valore massimo per la razza Appenninica (0,11) e quello minimo, addirittura negativo, per la razza Rambouillet (-0,01). Un valore negativo sta ad indicare una forte introgressione tra le frequenze alleliche ma, nel caso specifico, il valore non è risultato significativamente differente da zero. È opportuno fare alcune considerazioni sulla Merino Rambouillet, che pur mostrando una bassa diversità genetica (dimostrata dal basso grado di eterozigosità), non presenta un'apparente disequilibrio (vedi tabella Hardy-Weinberg). Questo attesta come una bassa diversità genetica (la Rambouillet è da tempo conservata in Francia con pochi animali superstiti) non sia necessariamente indice di disequilibrio di Hardy-Weinberg apportato, ad esempio, dalla consanguineità che, in questo caso specifico, sappiamo essere tenuta sotto controllo tramite il famoso schema di selezione della Bergerie Nationale.

Nell'intero campione (474 individui) si sono osservati 609 alleli con un valore medio di 16 allei per locus (tabella 14). Il marcatore con un più elevato numero di alleli (33) è risultato essere il OarFcb304, mentre quello col valore più basso (5) è stato il marcatore ETH10. L'ETH10 è risultato essere quasi del tutto monomorfo in tutte le razze (tabella 16a) come riscontrato anche da altri autori nella specie ovina: Moiola *et al.* (2006) infatti, hanno riscontrato il valore medio di 2 alleli in alcune razze Italiane mentre, Glowatzki-Mullis *et al.* (2007), il valore medio di 3 alleli. Questo potrebbe spiegarsi in una mutazione puntiforme avvenuta all'interno della sequenza del marcatore che ne ha

interrotto le ripetizioni e quindi impedito la normale evoluzione (vedi introduzione).

Come indicatore dell'effettiva variabilità genetica si è considerato il valore del numero effettivo di alleli calcolato come il reciproco dell'omozigosità attesa. Tale valore esprime in maniera più precisa il grado di diversità rispetto al numero medio di alleli, in quanto prende in esame il numero di alleli ponderato per la loro frequenza attesa. In questo caso il marcatore con il valore più elevato è stato il CSSM66, mentre quello più basso è stato osservato sempre per il marcatore ETH10; il valore medio del campione totale è stato pari a $5,47 \pm 2,16$ (tabella 14), in linea o leggermente superiore, a quello riscontrato in altri studi (Arruga *et al.* 2001; Mukesh *et al.* 2006).

Insieme al numero totale di alleli si è proceduto alla conta degli alleli privati per ogni locus, ovvero di quegli alleli esclusivi di una sola razza, importanti ai fini della differenziazione tra le razze. In particolare, si è incontrato un totale di 122 alleli privati (valore medio per locus 3,21) con un valore massimo di 14 nel marcatore MAF214, valori di 1 allele privato per i marcatori BM8125, TGLA122, BM6526, ETH10, BM6526, OarFCB48, OarFCB20 e OarAE129; nei marcatori BM1824, MAF65, McM140 e OarVH72 non si sono incontrati alleli privati.

Successivamente, si è analizzato il grado di eterozigosità per ogni marcatore nel campione totale (tabella 14). Questo parametro non è tanto importante per definire il livello di variabilità (essendo comunque diretta conseguenza del numero di alleli osservato ed effettivo), ma per verificare l'equilibrio delle frequenze alleliche all'interno del campione statistico. Infatti, sono riportati i valori dell'eterozigosità attesa (detta anche diversità genica e calcolata in base alla legge di Hardy-Weinberg) e di quella osservata. Dai dati si evince che il marcatore INRA23 è risultato quello con il più alto valore (0,87) di eterozigosità sia osservata che attesa (minimo 0,20 nell'ETH10). Non risultano, invece, differenze sostanziali che facciano pensare ad un generale disequilibrio del campione. Complessivamente il valore medio di eterozigosità attesa è risultato alto e pari a $0,72 \pm 0,12$, sovrapponibile a quello ottenuto in 57 razze ovine Europee nel progetto Econogene (Peter *et al.* 2007).

Per avere un'idea più chiara dell'equilibrio del panel di marcatori all'interno dei diversi stadi di suddivisione del campione (individuo, razza, campione) si sono presi in esame i tre F statistic (tabella 14).

Il Fis, che indica l'eccesso di eterozigoti rispetto all'atteso nella sottopopolazione (nel nostro caso le razze), è risultato leggermente diverso da 0, con un valore di 0,06 ($p < 0,05$) soprattutto per alcuni marcatori che risultano avere una forte tendenza verso l'eccesso di omozigoti, ma è comunque del tutto trascurabile e in linea con quanto riscontrato da altri autori in razze centro-europee (Baumung *et al.* 2006). I marcatori ETH10 e OarAE129 hanno registrato i valori maggiori con un Fis rispettivamente di 0,46 e 0,34; con valori più bassi, ma comunque abbastanza elevati, si evidenziano i marcatori TGLA122 e TGLA126 con un Fis di 0,25 e 0,15 rispettivamente e il marcatore ETH225 con 0,18. Questi valori diversi da zero risultano da un eccesso di omozigoti difficile da attribuire a qualche causa specifica proprio perché relegato solo ad alcuni marcatori. Una delle cause potrebbe essere l'effetto diretto delle dinamiche di formazione delle popolazioni come l'isolamento o la suddivisione geografica per ragioni economico-sociali, politiche o semplicemente orografiche. Non meno di frequente può accadere che i già citati errori di tipizzazione, soprattutto gli alleli nulli, possano influenzare il divario tra frequenze attese e osservate.

Terza causa è da ricercarsi in forze selettive (naturali o artificiali) che abbiano in qualche modo influenzato la distribuzione delle frequenze alleliche.

Questo è stato anche riscontrato da Peter *et al.* (Peter *et al.* 2005b; Peter *et al.* 2007) per il marcatore OarAE129 probabilmente influenzato dal linkage con qualche gene sottoposto a selezione ambientale.

Sempre per il coefficiente Fis si sono riscontrati dei valori negativi (BM8125 e OarCP20), che comunemente vengono statisticamente assimilati a zero anche se alcuni autori (Mathews & Porter 1993) li riportano all'elevato turn-over dei riproduttori maschi e un'elevata gene flow tra le razze.

Il coefficiente Fst, che stima l'eccesso di omozigoti come fattore di suddivisione tra le razze, è risultato essere pari a 0,10 ($p < 0,05$) simile a quanto riscontrato da Lawson Handley *et al.* (2007) che hanno riscontrato un valore di 0,13 in

diverse razze europee. Tale risultato indica un alto grado di differenziazione razziale ed era atteso vista la notevole varietà delle razze utilizzate per lo studio e la loro dislocazione geografica. Si sono osservati valori massimi per il marcatore ETH10 (0,34) e CRSD247 (0,20) e minimi per il marcatore RM006 (0,02).

Per avere una conferma statistica dei risultati ottenuti con le analisi precedenti relativamente al disequilibrio, si è considerato ciascun marcatore all'interno di ciascuna razza tramite l'analisi dell'equilibrio di Hardy-Weinberg prendendo in esame i valori di probabilità (p - value).

Dalla tabella 15 si evince che i microsatelliti con il più alto disequilibrio di Hardy Weinberg sono risultati essere il OarAE129 con 9 razze in disequilibrio, il TGLA126 con 7, il TGLA122 e l'ETH225 con 6, l'ETH10 e il SPS115 con 5 confermando quanto emerso dalle analisi precedenti.

Un disequilibrio statisticamente significativo è stato similmente riscontrato da Peter *et al.*(2005b), Mukesh *et al.* (2006) e Buamung *et al.* (2006) per il marcatore OarAE129 e da Diez-Tascón *et al.* (2000) e Pranisha (2004) per il marcatore ETH255 in differenti razze merino provenienti dal Sud Africa.

Una deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (confermato dai valori di Fis) di alcuni marcatori estesa ad un gran numero di razze nel campione in studio e riscontrato da molti autori in bibliografia relativa a studi simili, è da attribuirsi alla presenza di errori di genotipaggio causati ad esempio da alleli nulli.

In questo caso è opportuno eliminare tali marcatori dalle successive analisi d'inferenza di popolazione in quanto potrebbero falsare i risultati ottenuti (Wilding *et al.* 2001).

Nelle tabelle 16a e 16b si sono riportati i valori di eterozigosità attesa per ciascun marcatore in ogni razza studiata tal fine di osservare il grado di diversità genetica presente in ciascuna di esse.

Il range dei valori va dal massimo di 0,86 per il marcatore TGLA126 e OarCP49 al minimo di 0,19 per ETH10. La media generale è di 0,72 (dato non tabulato) leggermente inferiore a quanto osservato da Diez-Tascón *et al.* (2000), ma del

tutto sovrapponibile, come i dati riferiti alle singole razze e marcatori, con quanto riscontrato da Peter *et al.* (2007) in numerose razze europee.

	BM8125	BM1818	BM1824	CSRD247	CSSM66	ILSTS11	INRA6	MAF65	SPS115	TGLA122	BM6506	ETH225	ETH10	INRA35	INRA63	TGLA126	TGLA53	BM6526	OarCP20	OarCP34	OarFCB304	RM006	D5S2	HSC	MAF209	McM527	OarFCB11	OarFCB48	FCB20	MAF214	MCM140	OarCP49	INRA23	OarVH72	OarJMP29	ILST005	OarAE129	OarFCB193	N			
MES				*		*			*	*	*	N								*																	*				7	
SOP				*	*					*	*	*			*	*			*					*							*							*				12
MEI														*		*															*						*				4	
MPZ	*						N			*			N											*				*								*		*			6	
FLC							*			*			N			*								*												*		*			4	
GEP			*	*	*	*	*			*		*	*											*				*		*							*		*		9	
POL		*									*	*	*				*					*			*								*					*			7	
RAM	N				N		N	N	N	N	N		N	N	N	N		N	N				N	N			N	N			N	N	N	N	N							
MDA	N				N		N	N	N	N	N		N	N	N	N	*	N	N				N	N			N	N			N	N	N	N	N			*			1	
MEL	N				N		N	N	N	N	N		N	N	N	*	N	N					N	N			N	N			N	N	N	N	N			*			2	
SEG								*	*	*	*	*				*	*				*		*			*		*		N	N	N	N	N	N	N	N	N			8	
APP		*	*	*	*	*	*					*	*			*	*						*	*		*							N	N	N	N	N	N			9	
MPP								*	*	*		*	*			*	*		N	N		N	*	*		*							N	N	N	N	N	*			6	
MBA	*				*		*	*	*	*	*	*			*	*	*	*	N	N		N	*	*		*											*	*			7	
MBX		*	*	*			*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	N	N		N	*	*		*				*						*	*		*		10	
N	2	3	4	4	3	3	5	6	1	6	5	1	7	4	2	1	1	1	1	3	2	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	9	1				

Tabella 15: significatività del disequilibrio di Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) secondo il metodo delle catene di Marcow. Le “N” indicano i marcatori per quale non è stato possibile calcolare il dato per la presenza di missing data o basso polimorfismo del marcatore.

Locus	BM8125	BM1818	BM1824	CSR247	CSSM66	ILSTS11	INRA6	MAF65	SPS115	TGLA122	BM6506	ETH225	ETH10	INRA35	INRA63	TGLA126	BM6526	OarCP20	TGLA53
MES	0,72	0,50	0,75	0,78	0,83	0,76	0,75	0,69	0,75	0,72	0,77	0,62	0,03	0,71	0,80	0,83	0,71	0,78	0,87
SOP	0,65	0,88	0,78	0,78	0,89	0,86	0,53	0,77	0,75	0,85	0,63	0,63	0,11	0,68	0,88	0,87	0,78	0,78	0,81
MEI	0,60	0,88	0,74	0,77	0,88	0,76	0,84	0,73	0,71	0,84	0,69	0,62	0,22	0,79	0,89	0,91	0,76	0,82	0,86
MPZ	0,69	0,87	0,71	0,70	0,74	0,73	0,00	0,69	0,77	0,70	0,59	0,66	0,00	0,68	0,76	0,81	0,57	0,69	0,77
FLC	0,71	0,72	0,62	0,76	0,79	0,71	0,75	0,64	0,80	0,55	0,76	0,52	0,00	0,71	0,68	0,82	0,78	0,64	0,83
GEP	0,71	0,81	0,77	0,75	0,84	0,86	0,65	0,74	0,64	0,81	0,68	0,62	0,26	0,80	0,83	0,88	0,80	0,88	0,78
POL	0,80	0,89	0,84	0,63	0,86	0,79	0,57	0,69	0,79	0,81	0,76	0,63	0,39	0,78	0,84	0,85	0,71	0,72	0,88
RAM	0,46	-	0,55	0,49		0,58	-	0,74	-	-	-	-	-	-	0,41	-	-	-	0,35
MDA	0,64	-	0,78	0,80		0,79	-	0,77	-	-	-	-	-	-	0,82	-	-	-	0,81
MEL	0,60	-	0,76	0,83		0,74	-	0,75	-	-	-	-	-	-	0,84	-	-	-	0,82
SEG	0,65	-	0,76	0,78	0,85	0,77	-	0,68	0,71	0,83	0,70	0,54	0,16	0,74	0,61	0,90	0,67	0,78	0,79
APP	0,69	0,96	0,79	0,72	0,87	0,83	0,71	0,69	0,57	0,80	0,69	0,72	0,57	0,86	0,73	0,82	0,79	0,81	0,85
MPP	0,68	0,90	0,68	0,68	0,91	0,74	0,71	0,75	0,77	0,83	0,77	0,55	0,28	0,77	0,79	0,87	0,90	-	0,81
MBA	0,77	0,92	0,71	0,71	0,87	0,71	0,62	0,71	0,74	0,83	0,73	0,61	0,07	0,73	0,85	0,89	0,92	-	0,82
MBX	0,66	0,85	0,63	0,64	0,85	0,79	0,68	0,75	0,73	0,83	0,80	0,62	0,16	0,75	0,88	0,89	0,89	-	0,79
media	0,67	0,83	0,72	0,72	0,85	0,76	0,62	0,72	0,73	0,78	0,72	0,61	0,19	0,75	0,77	0,86	0,79	0,77	0,77

Tabella 16 a: valori di eterozigotità attesa per razza e per marcatore (primi 19 marcatori).

	OarCP34	OarFCB304	RM006	D5S2	HSC	MAF209	McM527	OarFCB11	OarFCB48	FCB20	MAF214	MCM140	OarCP49	INRA 23	OarVH72	OarJMP29	ILST005	OarAE129	OarFCB193
MES	0,76	0,70	0,54	0,66	0,88	0,80	0,76	0,84	0,68	0,86	0,68	0,75	0,90	0,86	0,61	0,81	0,78	0,65	0,49
SOP	0,72	0,76	0,61	0,70	0,89	0,71	0,77	0,73	0,84	0,83	0,72	0,80	0,89	0,89	0,71	0,77	0,77	0,55	0,40
MEI	0,83	0,63	0,64	0,75	0,86	0,76	0,80	0,78	0,76	0,81	0,77	0,84	0,89	0,85	0,74	0,86	0,74	0,81	0,45
MPZ	0,56	0,45	0,67	0,75	0,82	0,74	0,66	0,64	0,70	0,71	0,51	0,75	0,85	0,84	0,53	0,88	0,69	0,68	0,62
FLC	0,69	0,60	0,43	0,49	0,82	0,74	0,60	0,78	0,80	0,72	0,69	0,75	0,75	0,82	0,59	0,71	0,63	0,58	0,47
GEP	0,75	0,76	0,63	0,64	0,81	0,73	0,74	0,77	0,69	-	0,69	0,85	0,84	0,87	0,79	0,77	0,76	0,66	0,24
POL	0,75	0,71	0,59	0,74	0,87	0,84	0,76	0,85	0,83	0,74	0,77	0,77	0,85	0,90	0,70	0,77	0,70	0,67	0,49
RAM	0,71	0,45	-	-	0,67	0,54	0,44	-	-	0,67	0,67	-	-	-	-	0,50	0,67	0,55	0,07
MDA	0,79	0,67	-	-	0,88	0,78	0,76	-	-	0,83	0,70	-	-	-	-	0,87	0,78	0,68	0,58
MEL	0,75	0,57	-	-	0,86	0,82	0,81	-	-	0,81	0,75	-	-	-	-	0,86	0,64	0,71	0,42
SEG	0,71	0,84	0,67	0,71	0,91	0,80	0,82	0,79	0,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APP	0,80	0,75	0,64	0,71	0,89	0,81	0,71	0,88	0,72	0,79	0,79	-	-	-	-	-	-	-	-
MPP	-	0,79	-	0,77	0,87	0,75	0,81	0,77	0,76	0,87	0,70	0,78	0,84	0,88	0,71	0,73	0,60	0,53	0,54
MBA	-	0,66	-	0,71	0,88	0,74	0,77	0,79	0,81	0,84	0,72	0,79	0,91	0,88	0,73	0,83	0,82	0,69	0,61
MBX	-	0,83	-	0,63	0,82	0,77	0,80	0,82	0,75	0,82	0,65	0,83	0,88	0,89	0,72	0,80	0,73	0,63	0,42
Media	0,74	0,68	0,60	0,69	0,85	0,75	0,73	0,79	0,76	0,79	0,70	0,79	0,86	0,87	0,68	0,78	0,72	0,65	0,45

Tabella 16b: valori di eterozigotità attesa per razza e per marcatore (ultimi 19 marcatori).

❖ ***Studio della differenziazione genetica***

Inferenza classica

Di seguito, come primo metodo di inferenza per lo studio della differenziazione genetica, viene riportata la matrice delle distanze genetiche secondo il metodo Reynolds J., unweighted (1983) nel quadrante superiore e con il metodo Nei *et al.*, Da (Nei *et al.* 1983) in quello inferiore e le rispettive rappresentazioni grafiche (tabella 17 e figure 35, 36 e 37).

Tutte le analisi statistiche sono state condotte eliminando dal dataset i cinque marcatori che abbiamo individuato come in disequilibrio di Hardy-Weinberg per avere una migliore affidabilità e correttezza del risultato.

Tutti i metodi e le relative distanze utilizzate sembrano comunque dare risultati pressoché sovrapponibili.

Le distanze genetiche per molto tempo sono state uno strumento utilissimo per lo studio delle relazioni genetiche, tuttavia, nell'ambito delle razze domestiche presentano molti limiti. Infatti, tutti i metodi di calcolo delle distanze presuppongono che non ci sia migrazione, che la popolazione mantenga un numero di individui costante e che il campione sia il più esteso possibile (Richard & Thorpe 2001).

Sappiamo che proprio la migrazione (forzata per mano dell'uomo con le importazioni) sta alla base della differenziazione ed evoluzione delle razze domestiche, soprattutto in un continente come l'Europa, dove le vicende storiche hanno provocato grandi sconvolgimenti nelle popolazioni di uomini e animali.

Inoltre, siccome il modello di mutazione si conosce solo in maniera parziale, è difficile scegliere il metodo di calcolo adeguato; quindi questo metodo va analizzato con le dovute cautele del caso, ponderando i risultati per le opportune considerazioni storiche.

Il dato che più appare eclatante è l'elevata distanza genetica che la razza Merino Rambouillet ha rispetto alle altre, con un valore medio di 0,52 nel caso

della distanza DA di Nei e 0,23 con il metodo Reynolds. Ciò è probabilmente da imputarsi al forte isolamento al quale la razza è stata sottoposta nel suo luogo di conservazione (Bergerie Nationale); questo, come trattato in precedenza, non ha provocato uno stato molto grave di consanguineità ma comunque una perdita completa di relazioni genetiche forti con le altre razze di derivazione Merino.

Dal dendrogramma si evince, comunque, la stretta vicinanza con le altre due razze tipicamente francesi, la Est-a-laine e la D'Arles perché, come noto nei primi anni di formazione delle Merinos Francesi ci fu un enorme rimescolamento di animali. Queste ultime due risultano fortemente correlate, probabilmente per lo stesso motivo e per un possibile recente interscambio di animali, visto che vengono tutt'ora allevate in Francia.

In tutte le rappresentazioni le tre razze Portoghesi presentano una forte relazione tra loro. Infatti, tra la M. Branco e Preto si stabilisce, secondo la distanza DA di Nei, un valore di 0,09, molto simile a quanto riscontrato in un lavoro del 2000 proprio su alcune razze Merino dove la stessa relazione era di 0,11 (Diez-Tascón *et al.* 2000). Anche la M. Beira Baixa presenta una forte vicinanza genetica con le altre due razze portoghesi.

Risulta anche interessante il fatto che queste ultime tre non hanno una forte relazione genetica col Merino Spagnolo, che si crede sia stato importato per migliorare la popolazione Portoghese a più riprese (distanza media DA di Nei, 0,25). Molto probabilmente le barriere naturali, rappresentate dalle catene montuose tra Spagna e Portogallo, insieme a sempre più stretti vincoli sanitari tra i paesi europei, hanno facilitato la differenziazione tra i due ceppi Iberici della Merino.

	MES	SOP	MEI	MPZ	FLC	GEP	POL	RAM	MDA	MEL	SEG	APP	MPP	MBA	MBX
MES		0,05	0,03	0,10	0,06	0,06	0,07	0,26	0,05	0,07	0,04	0,08	0,07	0,07	0,08
SOP	0,16		0,03	0,11	0,06	0,03	0,05	0,27	0,05	0,07	0,06	0,07	0,05	0,05	0,05
MEI	0,12	0,12		0,08	0,05	0,03	0,05	0,27	0,05	0,07	0,04	0,06	0,05	0,06	0,06
MPZ	0,21	0,25	0,19		0,10	0,11	0,12	0,31	0,11	0,16	0,10	0,15	0,12	0,12	0,13
FLC	0,17	0,18	0,16	0,19		0,07	0,08	0,30	0,10	0,11	0,08	0,11	0,09	0,09	0,10
GEP	0,17	0,13	0,12	0,23	0,19		0,04	0,25	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05
POL	0,21	0,19	0,17	0,26	0,24	0,15		0,28	0,05	0,08	0,07	0,06	0,05	0,06	0,06
RAM	0,54	0,52	0,52	0,53	0,54	0,46	0,51		0,19	0,19	0,23	0,22	0,27	0,25	0,28
MDA	0,23	0,24	0,24	0,33	0,30	0,21	0,23	0,37		0,03	0,08	0,08	0,06	0,08	0,07
MEL	0,25	0,26	0,27	0,37	0,31	0,22	0,26	0,37	0,11		0,09	0,08	0,07	0,08	0,08
SEG	0,13	0,16	0,13	0,22	0,18	0,17	0,22	0,47	0,28	0,30		0,08	0,08	0,10	0,09
APP	0,27	0,25	0,23	0,36	0,31	0,19	0,20	0,48	0,31	0,30	0,24		0,08	0,09	0,09
MPP	0,25	0,21	0,21	0,31	0,28	0,21	0,20	0,50	0,27	0,29	0,29	0,29		0,01	0,01
MBA	0,24	0,21	0,21	0,30	0,28	0,20	0,22	0,47	0,29	0,31	0,29	0,31	0,09		0,02
MBX	0,26	0,21	0,23	0,32	0,30	0,22	0,23	0,51	0,28	0,30	0,29	0,32	0,10	0,11	

Tabella 17: valori delle distanze genetiche tra le razze in studio (metodo Reynolds J., unweighted 1983, nel quadrante superiore e con il metodo Nei et al., Da di Nei et al. 1983 in quello inferiore).

Sembra più evidente, come mostrato più avanti, un interscambio di animali tra le tre razze, dovuto presumibilmente al comune areale di allevamento.

Anche il Merino Preto, ritenuto un genotipo a se stante e ben differenziato, risulta poco distante dalle sue “conterranee” e questo fatto potrebbe rappresentare un segno dei possibili rinsanguamenti e miglioramenti tentati col Merino Branco a causa dello scarso valore della lana nera.

Le altre due razze del campione, la M. Precoce e la Fleiscaf, campionate sul territorio spagnolo, dove sono oggi allevate, non conservano una particolare vicinanza con la Ramboulliet, la D’Arles e la Est-a-laine con le quali dovrebbero condividere le origini e la formazione (vedi introduzione). Solo nel caso della distanza DA Nei e nel relativo dendrogramma costruito con metodo UPGMA (fig 36), la M. Precoce sembra avere una certa vicinanza con la Est-a-Laine e la M. D’Arles (valore medio 0,35). Il loro allevamento in un ambiente diverso e la possibile deriva genetica verificatesi nel momento dell’importazione in Spagna hanno reso possibile una certa divergenza.

Infine, la forte relazione tra queste due e il merino Spagnolo (0,17) deriva dal fatto che, per anni, sono state utilizzate in programmi di miglioramento del progenitore Iberico, ai fini di migliorarne la produzione di lana e carne (Delgado *et al.* 1998) e tutt’oggi, sono numerosi i casi di incrocio programmato e di allevamento promiscuo. Esse stesse sono allevate, in moltissimi casi, come un’unica razza e da ciò deriva la bassa distanza genetica (0,19).

Pratiche e fini selettivi comuni, nell’ambito dello stesso paese sono spesso causa di divergenza genetica tra le razze come nel caso delle razze merinizzate italiane che hanno tra loro bassi valori di distanza genetica.

I risultati ottenuti, infatti, hanno evidenziato una distanza genetica tra Merinizzata Italiana e Sopravissana e Merinizzata Italiana e Gentile di Puglia pari a 0,12. L’altra razza italiana non derivata merino, l’Appenninica, risulta da queste lontana (0,22). Infine, la Merinos spagnola risulta avere una più bassa distanza genetica dalla Merinizzata Italiana (0,12).

Dall’analisi delle distanze genetiche e dall’osservazione del dendrogramma notiamo che, in generale, tra le tre razze italiane si ha un basso valore medio della distanza genetica, pari a 0,12 contro un valore medio totale di 0,26

osservato nelle restanti razze, a conferma dell'origine comune delle stesse. La razza Appenninica, o meglio le sue antiche varietà, dalle quali a partire dal 1435 d.C. fino alla seconda metà del 1800, si sarebbero formate le due razze merinizzate italiane originarie (Sopravissana e Gentile di Puglia) mostra una certa vicinanza con queste due, pur evidenziando un valore delle distanze genetiche elevato (0,22); ciò è probabilmente dovuto al più intenso lavoro selettivo effettuato negli ultimi anni su questa razza.

La Merinizzata Italiana sembra avere una maggiore relazione genetica con il Merinos Spagnolo e Precoce, fatto spiegabile storicamente con le numerose importazioni di riproduttori di razze merinizzate straniere, tra cui il Merinos Precoce, ma anche la Wüttemberg, il Merinos D'Arles e il Merinos Fleischaf, effettuate nella seconda metà del 1900 per migliorare la produzione di carne delle razze italiane (Pollidori *et al.* 1989); infatti, anche dai vari dendrogrammi, si nota la vicinanza con queste ultime soprattutto nel Neighbor - Joining a partire dalla distanza di Reynolds (figura 37).

Appare alquanto strana la forte relazione genetica tra le razze italiane e la M. Polish con entrambi i metodi di calcolo delle distanze e in tutti i dendrogrammi, infatti questa riporta un valore di 0,19 nella distanza DA di Nei contro un valore medio di 0,24 con tutte le altre; anche se confrontata con l'Appenninica si osserva un valore più basso rispetto al totale (0,20). Nel progetto europeo Econogene (Peter *et al.* 2007), analizzando la distanza di Reynolds si è osservato, similmente un valore di 0,07 tra M. Polish e Gentile di Puglia contro un valore medio totale di 0,14, mentre in questo lavoro nella stessa distanza si osservava un valore tra le due di 0,04 contro il un valore medio totale di 0,07.

Questo è probabilmente spiegabile con la ben nota introduzione di animali dall'Est Europa in Italia, nel decennio 1970-80 che importati come soggetti da macello, venivano talora utilizzati come riproduttori nelle greggi prevalentemente nelle province abruzzesi, molisane e pugliesi.

Infine, la razza Segureña, altra razza di riferimento non merino e proveniente dalla Spagna, risulta essere strettamente correlata al Merino Spagnolo, a causa dei numerosi tentativi di miglioramento genetico effettuati con sangue merino per aumentarne la mole e la produzione di carne.

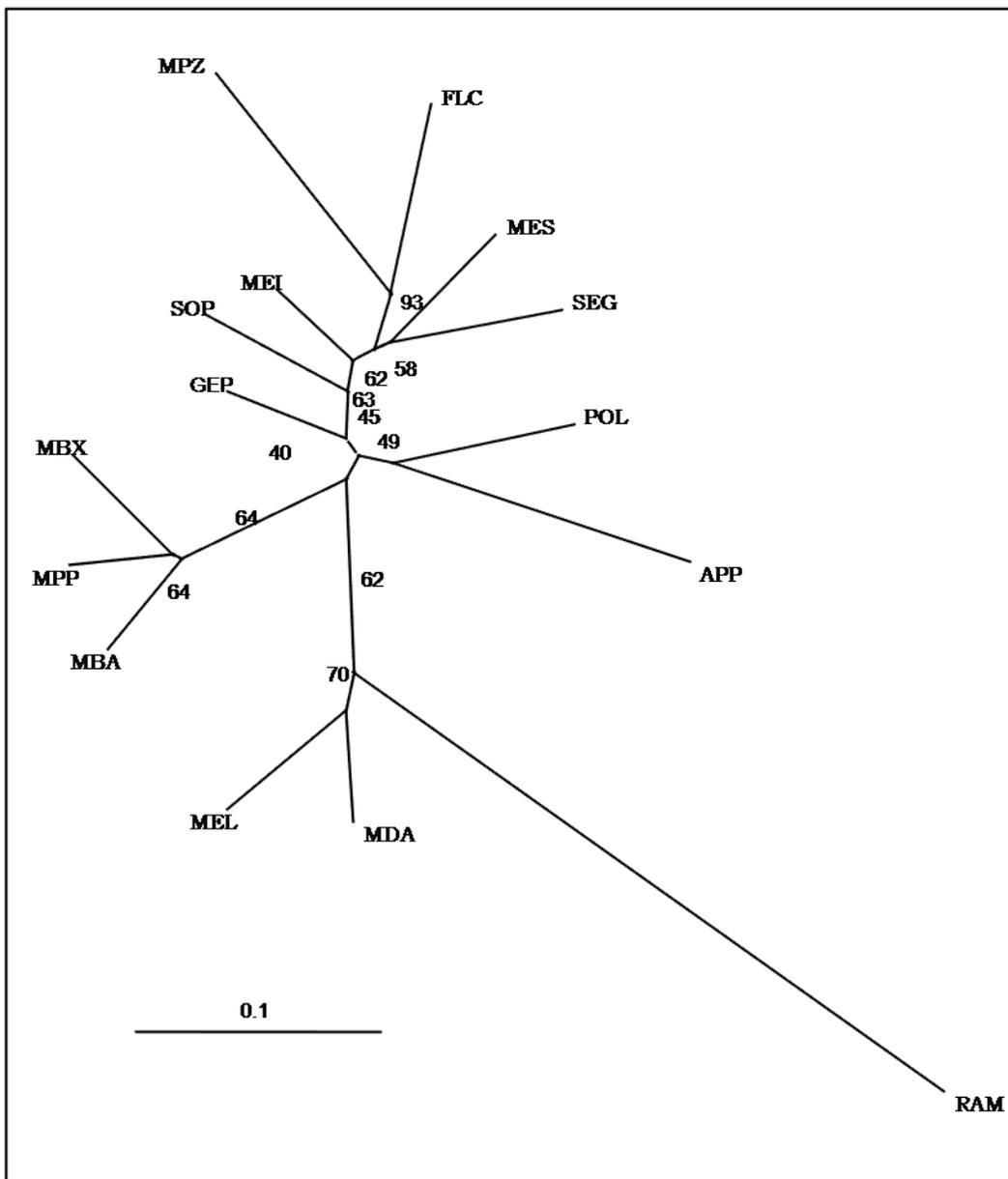


Figura 35: dendrogramma costruito su 1000 bootstraps con metodo Neighor.- Joining a partire della distanza DA (Nei 1972)

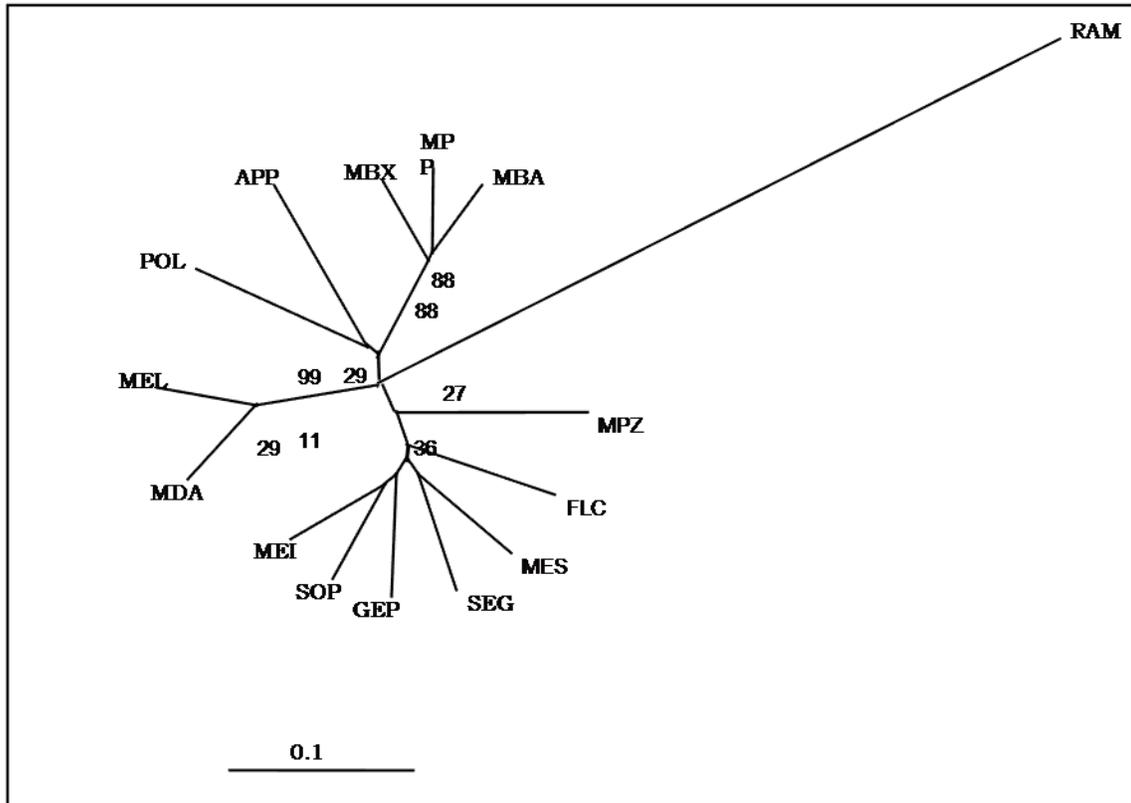


Figura 36: dendrogramma costruito su 1000 bootstraps con metodo UPGMA a partire della distanza DA (Nei 1972).

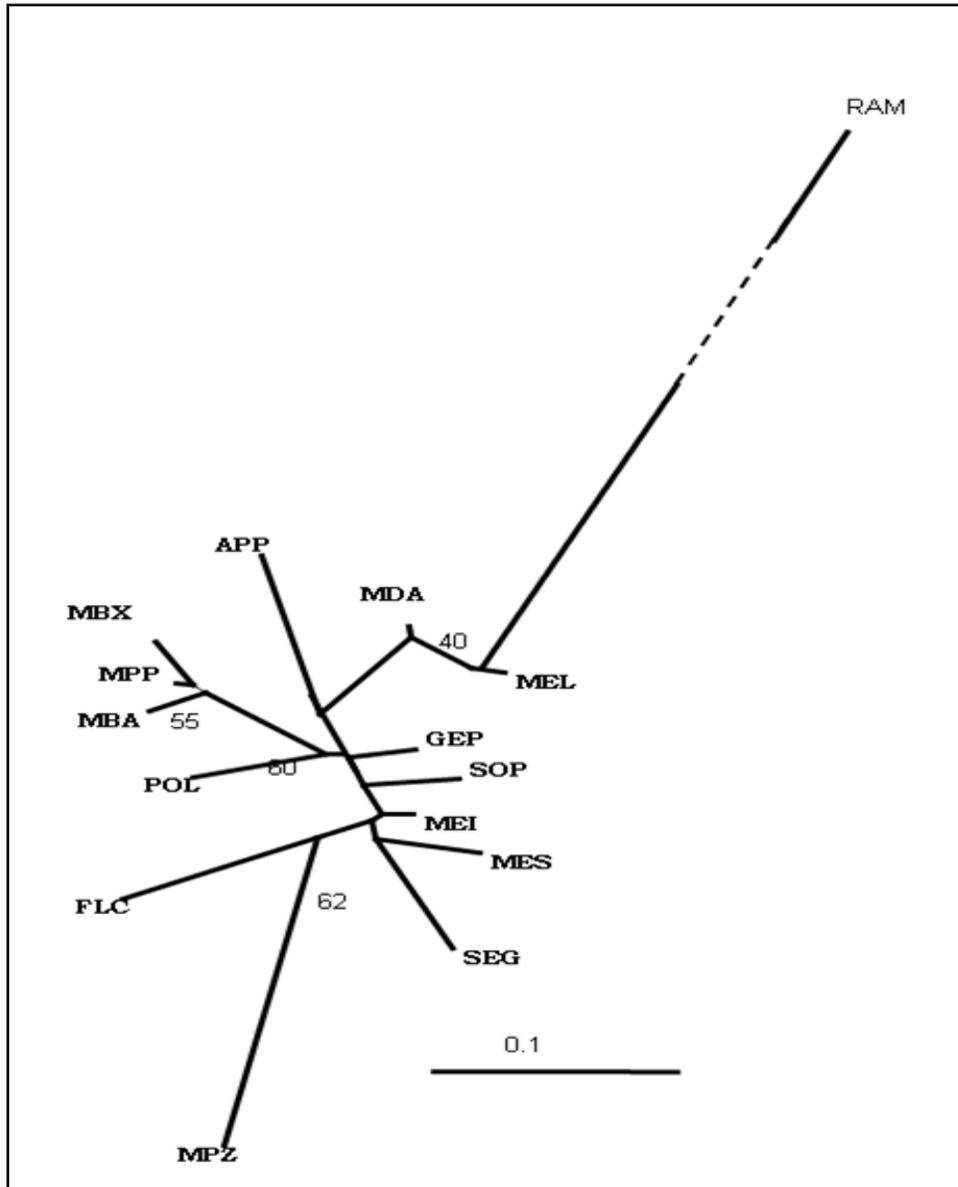


Figura 37: dendrogramma costruito su 1000 bootstraps con metodo Neighbor - Joining a partire della distanza di Reynolds (Reynolds et al. 1983).

Studio della struttura del campione con metodo Bayesiano

Questo tipo di analisi è stato sviluppato utilizzando il software Structure 2.2.3 (Pritchard *et al.* 2000) che utilizza un algoritmo bayesiano (figura 39).

L'algoritmo suppone che la popolazione sia in equilibrio Hardy-Weinberg e quindi anche in questo caso si sono eliminati dal dataset quei marcatori in disequilibrio.

Il primo risultato che appare evidente è che non esiste una differenziazione netta tra razze di derivazione merino e razze non merinizzate. Questo trova la spiegazione nel fatto che la Merino è la razza più diffusa al mondo ed è stata utilizzata in tutti i paesi come razza miglioratrice su innumerevoli razze locali. Infatti, si vede che per $k=2$ (tabella 18 e figura 39) le due razze di riferimento, l'Appenninica e la Segureña, non si separano dalle razze merino ma si trovano ad esse mescolate. Sembra delinearsi una divisione logica in razze merino di selezione o influenza francese (cluster rosso) quali le merino Portoghesi. Infatti, nella fase di formazione delle merino portoghesi, secondo resoconti storici, furono importanti la Merino Rambouillet e D'Arles.

Nell'altro cluster (verde) sembra invece delinearsi il gruppo delle razze che hanno più subito l'influenza del Merino Spagnolo, sia in passato come le razze merinizzate italiane (importazioni di epoca Aragonese prima e napoleonica poi), sia in tempi recenti come nel caso del Merino Precoce e Fleischaf che hanno continuo interscambio con il progenitore iberico (vista anche la provenienza del campione utilizzato in questo studio).

Questo raggruppamento si protrae fino al $k=5$, quando si separano chiaramente in un unico cluster le razze Portoghesi (cluster rosso) e nel gruppo delle razze francesi o di loro derivazione si separa (cluster violetto) la Merino Rambouillet, in virtù del già citato isolamento.

In questo caso, quasi in modo inspiegabile, la razza Appenninica, si raggruppa con il gruppo delle francesi, probabilmente perché anche questa ha avuto in passato, interventi di miglioramento tramite l'incrocio con razze estere, soprattutto francesi, come la Ile-de-France.

Gli altri due cluster (verde e giallo), separano le razze direttamente discendenti o fortemente influenzate dal Merino (Merino Spagnolo, Sopravissana e Segureño) e quelle sempre discendenti da esso ma che hanno un iter selettivo più spinto.

La Merinizzata italiana, si situa anch'essa nel cluster delle razze più vicine al Merino Spagnolo e questo è spiegabile con il fatto che, essendo una razza costituita da un lungo processo di meticciamento delle razze merinizzate italiane più antiche, riassume in sé, l'influenza degli altri tipi genetici europei.

Dal $K=12$ in poi si nota che le Merino Portoghesi sono raggruppate in un unico cluster non definibile da nessuna struttura ulteriore (rosso) e le razze Segureña e Appenninica sono ben differenziate in due gruppi distinti (marrone e blu).

In $k=15$ (dove k =numero di popolazioni) notiamo che il livello di differenziazione è abbastanza alto in tutto il campione con un valore pari a 0,79 (tabella 18). In questo livello si nota fondamentalmente ancora la presenza di un unico gruppo non definito delle Merino Portoghesi ed uno contenente la Merino Est-a-laine e D'arles. La razza Sopravissana, che nei cluster precedenti faceva registrare una struttura più netta, presenta una divisione in tre sottogruppi. Questo è dovuto al fatto che questa, ormai in stato di forte decremento numerico, non ha subito un programma di miglioramento efficace negli ultimi anni a causa della crisi del settore ovicaprino, fatto che ha contribuito, insieme all'isolamento geografico a creare delle vere e proprie varietà all'interno della razza stessa. La Gentile di Puglia e la Merinizzata Italiana risultano le razze con una più bassa percentuale di assegnazione (0,63 e 0,57 rispettivamente), in quanto tra i due tipi genetici, c'è stato fino a pochi decenni fa, un intenso interscambio di individui che non sono chiaramente assegnabili ad una delle due razze.

In figura 38 si riporta il grafico di tendenza della funzione baynesiana che esprime nel punto di flesso il numero più probabile di cluster che il programma ritrova, ovvero quel numero di K , per il quale l'algoritmo può dare risultati statisticamente significativi e ripetitivi, che in questo caso appare essere intorno a $k = 11/12$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MES	0,83	0,01	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01
SOP	0,01	0,01	0,29	0,01	0,02	0,02	0,15	0,01	0,00	0,01	0,28	0,01	0,01	0,01	0,18
MEI	0,07	0,02	0,02	0,02	0,63	0,03	0,04	0,01	0,00	0,03	0,04	0,01	0,05	0,01	0,02
MPZ	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,91	0,00	0,00
FLC	0,01	0,01	0,00	0,90	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01
GEP	0,01	0,03	0,01	0,02	0,16	0,02	0,03	0,01	0,01	0,57	0,04	0,02	0,03	0,04	0,01
POL	0,01	0,83	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,04	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01
RAM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MDA	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,03	0,06	0,01	0,01	0,01	0,77	0,01
MEL	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,91	0,01
SEG	0,07	0,02	0,01	0,02	0,03	0,75	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02
APP	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,87	0,00	0,01	0,01
MPP	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,90	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01
MBA	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,89	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
MBX	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,88	0,00	0,03	0,02	0,01	0,00	0,01	0,01

Tabella 18: coefficiente di appartenenza a ciascun cluster dopo 500.000 iterazioni con 15 k assunti.

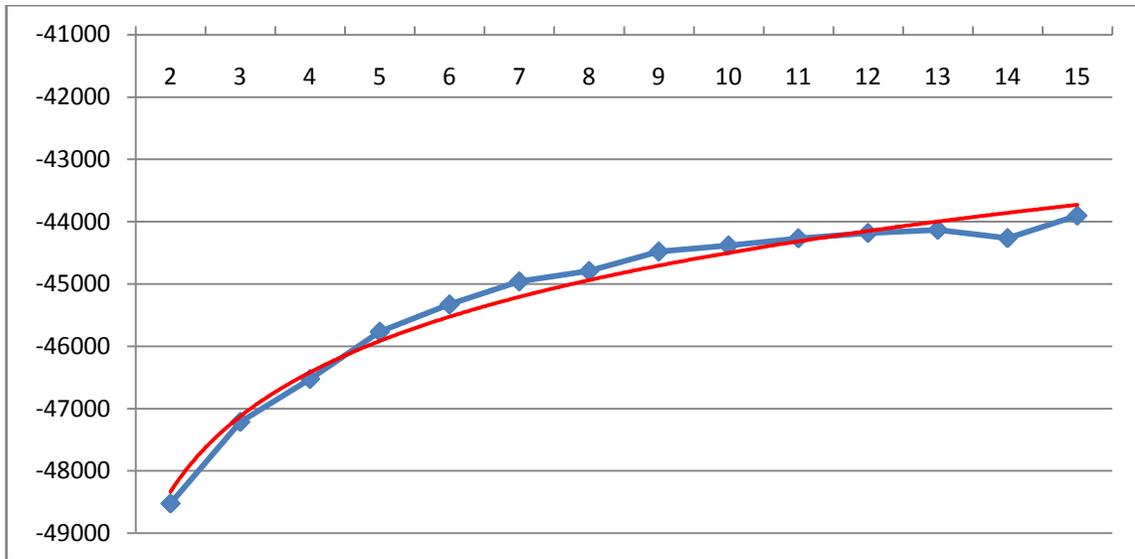


Figura 38: Grafico del valore medio del log k su 5 run indipendenti del software Structure e rispettiva linea di tendenza in rosso.

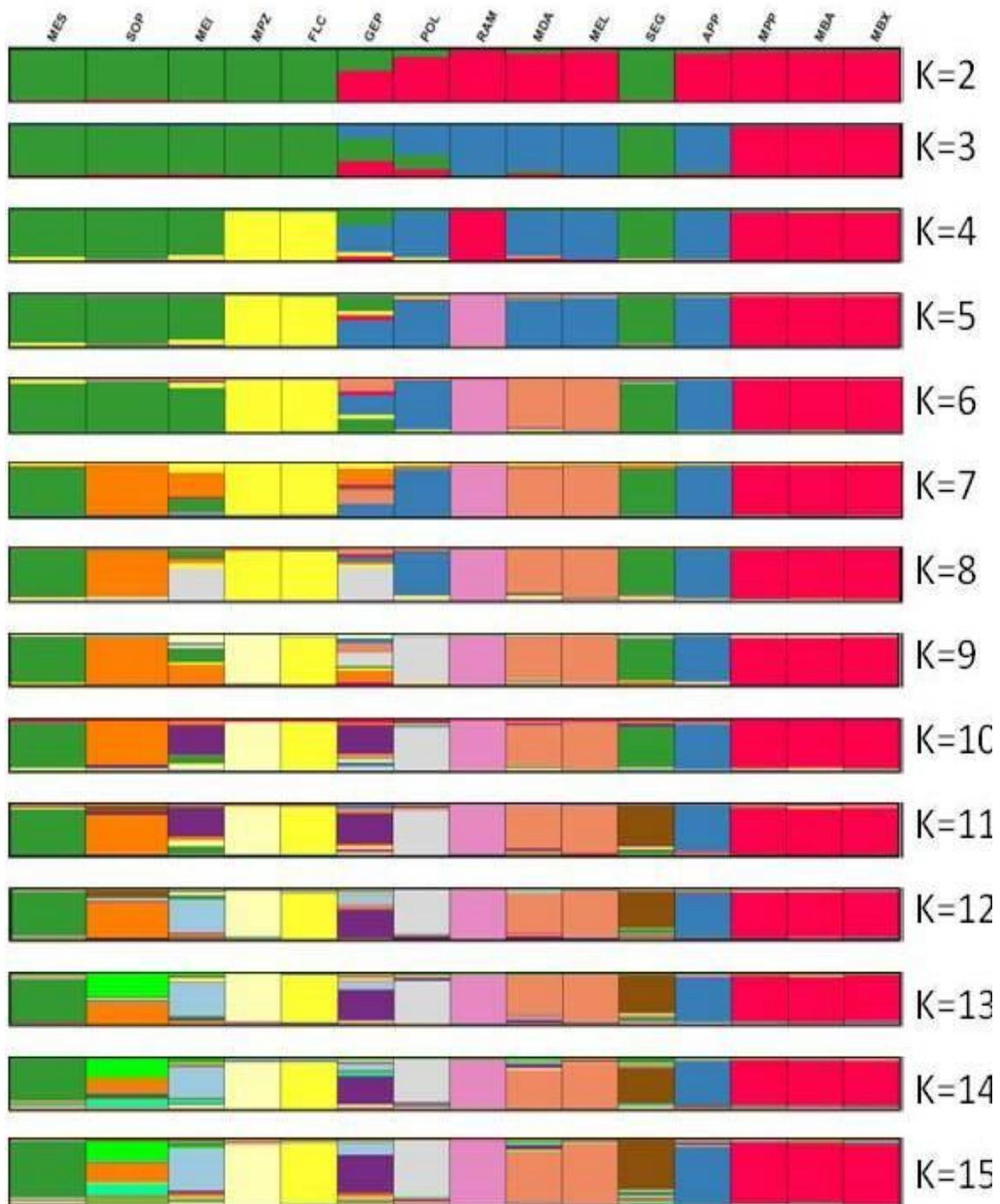


Figura 39: Percentuale di assegnazione degli individui delle razze studiate ai 15 cluster assumendo K=2→15.

Studio della capacità di assegnazione di un set di marcatori

Successivamente allo studio della struttura del campione, si è proceduto al confronto dei marcatori sulla base delle qualità come mezzo di esclusione. Questo è importante ai fini di determinare la possibilità di individuare un set ridotto di marcatori, utilizzabile per studi di tracciabilità, analisi di assegnazione a razza e test di parentela nelle razze ovine di derivazione Merino. Nella tabella 19 sono riportate le probabilità di non esclusione per un parente candidato (NE-1P), per parente candidato dato il genotipo dell'altro genitore (NE-2P) e di entrambi i genitori (NE-PP). Infine si è calcolata la probabilità di non esclusione di identità tra due individui non parenti e tra due fratelli (Jamieson & Taylor 1997). Si è riportato, infine, la frequenza stimata degli alleli nulli, sulla base dell'equilibrio delle frequenze alleliche.

Questi parametri, solitamente utilizzati nella scelta dei marcatori in studi di parentela e tracciabilità, sono stati riportati per valutare la qualità dei marcatori utilizzati nello studio della variabilità genetica del campione (Bredbacka & Koskinen 1999; Baron *et al.* 2002; Bonnet *et al.* 2002; Glowatzki-Mullis *et al.* 2007).

In base a queste caratteristiche e in base ai parametri di diversità genetica già analizzati all'inizio di questo capitolo è stata stilata una classifica (tabella 20) nella quale sono riportati, sotto forma di rank numerici, i punteggi di ciascun marcatore in base alle qualità richieste ad un buon marcatore per studi di popolazione ed individuali.

Quindi si è stilata una classifica in base al polimorfismo decrescente (N_o e H_e) e alla capacità di evidenziare una suddivisione nel campione ($F_{st} > 0$).

In seguito, si è effettuata, una classifica in base al valore crescente per la probabilità di non esclusione di paternità o di identità, caratteristiche utili per definire un protocollo di tracciabilità.

Inoltre, si è considerato il rank basato sulla frequenza stimata degli alleli nulli, particolarmente negativi nelle analisi di assegnazione o paternità, in quanto

possono creare dei falsi negativi. Infine, è stata fatta una classifica dei marcatori in base al numero crescente di alleli privati.

In base alla classifica in tabella 20 si sono generati 5 differenti dataset con diverso numero di marcatori.

Il primo raggruppa tutti i marcatori utilizzati anche per l'inferenza sul numero di popolazioni (senza i loci in disequilibrio), il secondo è formato da 10 marcatori scelti tra quelli con maggiori valori di eterozigosità attesa, il terzo è formato dai primi 10 marcatori scelti per numero totale di alleli privati, il quarto e il quinto, infine, sono formati da 10 e 15 marcatori, rispettivamente, scelti in base al rank di tutte le caratteristiche elencate in tabella 20 (parametri di diversità genetica e polimorfismo maggiori e parametri di probabilità di non esclusione minori). Inoltre, sono stati scartati quei marcatori in forte disequilibrio di Hardy-Weinberg o che sono risultati di difficile studio in laboratorio (difficoltà di utilizzo in multiplex, numerosi dati mancanti e problemi di visualizzazione in elettroforesi).

Questi diversi file di genotipi sono stati utilizzati per l'analisi statistica sempre tramite il software Structure assumendo un numero di cluster predefiniti di 15 (k =numero di popolazioni).

I risultati ottenuti, visibili in figura 40, per tutte le 5 prove mostrano tutti gli individui di ogni razza come una barra, rappresentante il suo genotipo; il colore rappresenta il cluster al quale è assegnato quell'individuo.

Locus	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	F(Nulli)
BM8125	0,71	0,53	0,33	0,13	0,44	-0,01
BM1818	0,39	0,24	0,09	0,03	0,32	0,05
BM1824	0,56	0,38	0,20	0,07	0,36	0,07
CSRD247	0,34	0,21	0,07	0,02	0,31	0,13
CSSM66	0,34	0,21	0,07	0,02	0,31	0,09
ILSTS11	0,44	0,28	0,12	0,04	0,33	0,08
INRA6	0,66	0,47	0,25	0,10	0,42	0,04
MAF65	0,67	0,50	0,31	0,11	0,41	0,02
SPS115	0,57	0,40	0,21	0,07	0,37	0,11
TGLA122	0,49	0,32	0,14	0,05	0,35	0,18
BM6506	0,61	0,43	0,24	0,09	0,39	0,05
ETH225	0,75	0,58	0,40	0,17	0,46	0,13
ETH10	0,97	0,87	0,77	0,56	0,76	0,47
INRA35	0,51	0,34	0,16	0,05	0,35	0,08
INRA63	0,46	0,30	0,13	0,04	0,34	0,04
TGLA126	0,36	0,22	0,08	0,02	0,31	0,10
TGLA53	0,48	0,31	0,13	0,04	0,34	0,05
BM6526	0,55	0,37	0,19	0,06	0,37	0,02
OarCP20	0,58	0,40	0,22	0,07	0,37	0,02
OarCP34	0,57	0,40	0,21	0,07	0,37	0,06
OarFCB304	0,51	0,34	0,15	0,05	0,35	0,12
RM006	0,79	0,62	0,43	0,19	0,50	0,01
D5S2	0,65	0,47	0,28	0,10	0,40	0,08
HSC	0,36	0,22	0,08	0,02	0,31	0,03
MAF209	0,48	0,31	0,13	0,04	0,34	0,08
McM527	0,62	0,44	0,26	0,09	0,39	0,07
OarFCB11	0,50	0,33	0,15	0,05	0,34	0,04
OarFCB48	0,57	0,39	0,19	0,07	0,38	0,03
FCB20	0,50	0,33	0,15	0,05	0,35	0,03
MAF214	0,61	0,43	0,22	0,08	0,39	0,05
MCM140	0,53	0,36	0,18	0,06	0,36	0,02
OarCP49	0,37	0,22	0,07	0,02	0,31	0,03
INRA23	0,36	0,22	0,07	0,02	0,31	0,02
OARVH72	0,70	0,53	0,34	0,13	0,43	0,05
OarJMP29	0,46	0,29	0,11	0,04	0,34	0,05
ILST005	0,58	0,40	0,21	0,07	0,37	0,07
OarAE129	0,65	0,48	0,28	0,11	0,41	0,27
OarFCB193	0,82	0,64	0,44	0,22	0,52	0,13
media	0,55	0,39	0,21	0,08	0,38	0,08

Tabella 19: probabilità di non esclusione per un parente candidato, per una parente dato il genotipo dell'altro parente, di entrambi i genitori, di identità tra individui non relazionati e tra fratelli e frequenza teorica degli alleli nulli.

locus	rank No	rank He	rank fst	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	Rank F (nul)	Rank PA
OarFCB304	1	30	5	16	16	14	13	14	32	25
MAF214	2	28	14	26	26	25	26	26	18	1
OARJMP29	3	11	17	9	9	8	8	9	16	2
OarCP49	4	2	32	6	3	1	1	1	8	3
CSSM66	5	4	20	1	1	2	2	2	29	6
CSRD247	6	23	4	2	2	3	3	3	33	7
INRA6	7	34	23	31	29	28	29	32	14	4
INRA63	8	13	10	10	10	10	9	10	12	8
HSC	9	5	24	3	4	5	4	4	9	13
MAF209	10	18	9	11	11	11	10	11	26	14
TGLA126	11	3	28	4	5	6	5	5	30	15
BM1818	12	6	18	7	7	7	7	7	15	18
BM6526	13	14	29	19	19	19	18	20	5	19
OarFCB11	14	7	21	14	14	15	14	12	13	26
FCB20	15	8	25	15	15	16	15	15	10	27
TGLA122	16	12	22	13	13	13	16	16	36	16
TGLA53	17	9	26	12	12	12	11	13	17	28
OarFCB48	18	16	33	21	21	20	20	25	11	29
INRA23	19	1	34	5	6	4	6	6	3	30
OarCP20	20	15	27	24	22	26	21	21	6	5
D5S2	21	29	11	29	30	30	30	29	28	9
McM527	22	21	30	28	28	29	27	27	24	11
OarFCB193	23	37	3	37	37	37	37	37	35	12
INRA35	24	19	7	17	17	17	17	17	27	10
OarCP34	25	20	12	22	23	22	22	22	21	17
RM006	26	36	38	36	36	36	36	36	2	20
ILST005	27	24	13	25	24	23	23	23	23	21
ILSTS11	28	17	6	8	8	9	12	8	25	22
SPS115	29	22	15	23	25	24	24	24	31	23
BM6506	30	25	16	27	27	27	28	28	19	24
ETH225	31	35	19	35	35	35	35	35	34	31
MCM140	32	10	35	18	18	18	19	18	4	35
OarAE129	33	33	1	30	31	31	31	30	37	32
BM8125	34	32	31	34	33	33	33	34	1	33
MAF65	35	26	36	32	32	32	32	31	7	36
BM1824	36	27	8	20	20	21	25	19	22	37
OarVH72	37	31	37	33	34	34	34	33	20	38
ETH10	38	38	2	38	38	38	38	38	38	34

Tabella 20: rank dei marcatori in base al polimorfismo e in base alla probabilità di esclusione, frequenza degli alleli nulli e alleli privati.

Nel primo caso (ricavato dalla precedente analisi della struttura di popolazione, figura 39) la percentuale di assegnazione alla popolazione corretta è stata, come già detto dello 0,79% (tabella 18 e figura 40-I).

Il valore ovviamente decresce con il decresce del numero di marcatori utilizzati per l'inferenza, ma con alcune distinzioni. Infatti, l'analisi condotta con i 10 marcatori con eterozigosità più alta, ha fatto registrare un valore molto più basso rispetto a quella condotta con i 10 marcatori raggruppati per tutte le caratteristiche della tabella 20 con un valore dello 0,27% contro lo 0,58% di assegnazione corretta (figura 40-II e 40-IV).

A conferma del fatto che l'aumentare del numero di marcatori aumenta la precisione dell'inferenza, l'analisi condotta con 15 marcatori raggruppati per tutte le caratteristiche sopra menzionate ha registrato un valore del 61% di assegnazione corretta (figura 40-V). Si nota anche dal grafico a barre (figura 40_V vs 40-I) che l'immagine di questa analisi è quasi sovrapponibile con quella condotta con tutti i loci.

Anche l'inferenza condotta con i 10 marcatori con più alleli privati (figura 40-III) ha fatto registrare dei valori abbastanza elevati di assegnazione (58%).

Questi risultati confermano che la scelta di un marcatore per usi pratici di analisi (test di parentela, tracciabilità e assegnazione di un individuo ad una razza) non può prescindere da uno studio preliminare di caratterizzazione, per evidenziare quei loci che non hanno un comportamento statisticamente corretto rispetto all'atteso delle frequenze.

Un buon panel di microsatelliti non è necessariamente quello che fa registrare il numero più alto di alleli e che ha in definitiva la maggiore diversità genetica. Quasi sempre un numero elevatissimo di alleli si traduce in un'instabilità del marcatore che lo rende poco risolutivo nel campione; invece, microsatelliti poco polimorfici risultano equamente distribuiti in tutte le razze studiate e per questo poco risolutivi di eventi demografici recenti.

Un parametro distinguente per un buon marcatore è la percentuale di alleli privati che è sintomo di un'evoluzione indipendente in una particolare razza, fatto che viene a creare delle condizioni di esclusività che aumentano di molto l'affidabilità e la potenza statistica di un'analisi.

Queste motivazioni sono evidenti quando si analizzano i dataset con i 15 e 10 marcatori scelti in base a tutte le caratteristiche considerate, tra le quali è importantissima la frequenza stimata degli alleli nulli e la probabilità di esclusione tra due individui non correlati.

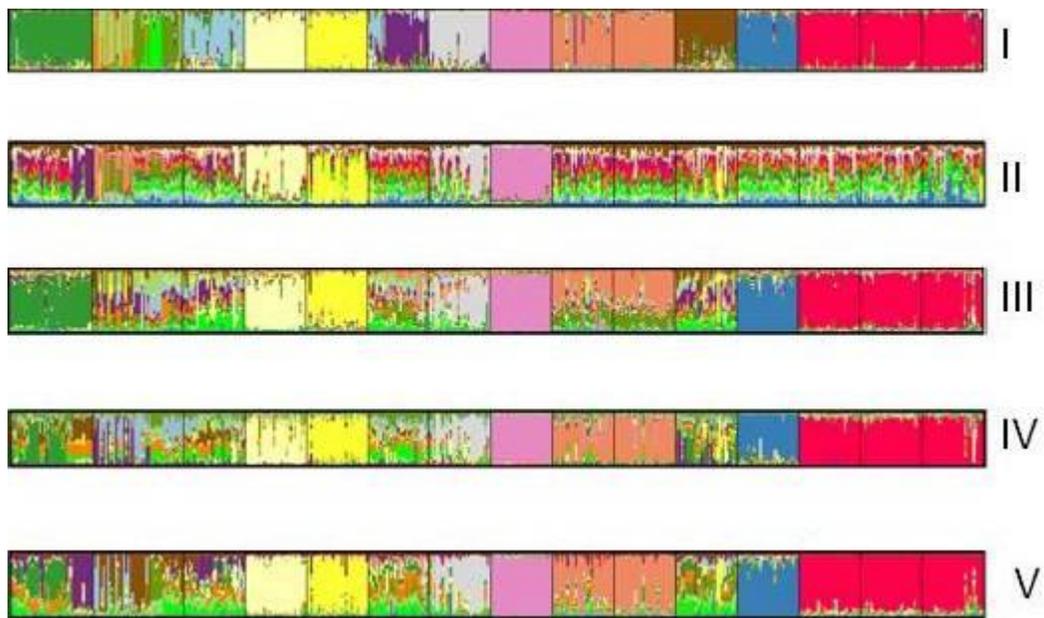


Figura 40: percentuale di assegnazione con 15 K assunti con tutti i 33 marcatori in equilibrio (I), con 10 marcatori con valori più alti di H_e (II), 10 marcatori con più alto valore di PA (III), 10 marcatori selezionati in base a tutti i parametri della tabella 20 (IV) e 15 marcatori selezionati in base a tutti i parametri della tabella 20 (V).

DIVERSITÀ E STUDIO FILOGENETICO TARMITE IL DNA MITOCONDRIALE.

❖ **Diversità aplotipica**

razza	N	π	nh	Hd	s
Gentile	7	0,00426	6	0,95	7
Merino S.	5	0,00183	3	0,70	3
Precoce	9	0,00171	5	0,72	5
Segureño	5	0,00213	4	0,900	3
Sopravissana	13	0,00394	9	0,872	14
Fleischaf	8	0,00314	7	0,964	8
M. Beira Baixa	5	0,00591	5	1,000	8
M. Preto	5	0,00245	3	0,700	4
M. Branco	5	0,01410	1	0,72	5
media	6,89	0,00282	4,8	0,83	5,78

Tabella 21: Diversi parametri di polimorfismo della sequenza nelle razze merino considerate nello studio del DNA mitocondriale.

In tabella 21 sono riportati alcuni parametri di diversità genetica delle sequenze di DNA mitocondriale utilizzate nello studio. Tra queste come riportato nei materiali e metodi, la Sopravissana, Gentile di Puglia, la Merinos Precoce e Fleischaf sono state ottenute da analisi di laboratorio nell'ambito di questo lavoro, mentre le altre reperite in Genebank.

Si riporta il numero di sequenze analizzate (N) insieme al numero di aplotipi riscontrati (nh); quest'ultimo è un parametro statistico esprime il polimorfismo di un campione di individui in base alla combinazione della sequenza base e l'insieme dei siti polimorfici nello stesso campione. Il numero di aplotipi è quindi calcolato per ciascuna sequenza come $1+n$ dove n è il numero totale di siti biallelici.

La differenza maggiore tra il numero di sequenze e l'effettivo numero di aplotipi (valore medio 4,8) si è riscontrato nella razza Merino Branco con un valore di 1 contro 5 sequenze considerate. Il valore massimo di 9 aplotipi su 13 sequenze considerate si osservato per la per la Sopravissana. Nel totale si sono osservati 43 aplotipi differenti su un totale di 62 sequenze considerate con un valore medio 5,78 siti polimorfici (s) per sequenza.

La diversità nucleotidica (π) è un altro parametro che esprime il polimorfismo ma sulla base dei singoli nucleotidi ed è utile per misurare l'effettiva variabilità

genetica del campione. È calcolato come il rapporto tra il numero di siti polimorfici e il totale dei siti. Nel campione considerato il valore massimo si è osservato nella razza M. Beira Baixa (0,00591) mentre il più basso nel Merino Branco che ha mostrato un valore uguale a 0. Il valore medio è risultato abbastanza alto, 0,00282, in linea con quanto ottenuto in un precedente lavoro su razze appartenenti al tronco Merino dove si è riscontrato un range che va da 0,0055 a 0,0141 (Pedrosa *et al.* 2007). La diversità aplotipica o diversità genica aplotipica, è del tutto analoga all'eterozigosità osservata e misura il valore del polimorfismo considerando ogni differente aplotipo come un marcatore "sintetico" composto dalle singole mutazioni. Il valore è risultato più basso da quello riscontrato da Pedrosa *et al.* (Pedrosa *et al.* 2005; 2007) a fronte di un valore medio di 0,99 contro lo 0,83 in questo lavoro, ma le differenze sono da attribuirsi alla differenza di numerosità del campione, quindi in definitiva il livello di polimorfismo e variabilità genetica è risultato medio - alto.

❖ **differenziazione genetica**

L'analisi delle sequenze del DNA mitocondriale ha rivelato un'alta alta variabilità, indicata dai parametri in tabella 21, in linea con quanto riscontrato dai già citati autori.

L'inferenza attraverso gli alberi filogenetici ha permesso di individuare le relazioni delle razze incluse nel campione con i diversi aplogruppi individuati nella specie ovina da altri autori (Hiendleder *et al.* 1998b; Tapio *et al.* 2006).

In figura 41 è visualizzato l'albero delle distanze Neighbor - Joining calcolato con il metodo p-distance dopo 1000 bootstraps su tutte le sequenze del campione. Questa raffigurazione servirà per avere un'idea preliminare delle relazioni filogenetiche tra le sequenze nel campione e permette di avere una prova dell'esattezza dell'analisi statistica, assicurandosi che il posizionamento di sequenze pubblicate da altri autori risulti sovrapponibile a quello ritrovato in letteratura. Infatti, si può osservare (cerchio rosa, figura 41) che le due specie di bovidi selvatici, l'Argali e l'Urial divergono fortemente dalle razze ovine

domestiche europee, mentre il Muflone non presenta differenze sostanziali da queste, come già descritto da Hiendleder et al. (1998b). L'Argali e l'Urial si trovano, invece, ad una distanza minore dagli aplogruppi prettamente asiatici, A, D ed E (cerchio blu e parentesi verde, figura 41). Si osserva inoltre che due animali di derivazione merino (PRE21 e MBR15) si situano nell'aplogruppo A, come alcuni individui della razza Gentile di Puglia e Sopravissana (cerchio verde). La maggior parte degli individui, tra cui alcuni della razza Sopravissana, del Merino precoce e tutti gli individui appartenenti alla razza Fleischaf si situano nel cluster nel quale si situano gli animali presi come riferimento per l'aplogruppo B, individuato da molti autori come quello delle razze europee (Hiendleder *et al.* 1998a).

Dallo studio del dendrogramma (figure 41) nonché dai due Network (minimum spanning Network e Median Joining, figure 42 e 43) si evince che il ceppo Merino presenta un'elevata frequenza di animali identificabili con l'aplogruppo B, rappresentato in figura 42 con un grosso cerchio di colore verde e in figura 43 con uno di colore giallo. Questi due cerchi rappresentano tutti gli individui che per similitudine di sequenza, vengono accorpati, per la costruzione dei due network in un unico cluster. I cerchi di grandezza ridotta che si situano ai lati dei primi due rappresentano gruppi di aplotipi che pur facendo parte dell'aplogruppo B hanno alcune differenze da esso; è il caso delle razze Merino Fleischaf, della razza Sopravissana e della razza Segureño.

Il metodo di rappresentare la relazione genetica tra gruppi di individui tramite Network, ha il vantaggio di non basarsi sulle distanze genetiche assolute ma sui punti di mutazione ancestrali (cerchi rossi) dai quali si dipartono i vettori che collegano gli aplotipi o gruppi di aplotipi; questo permette di visualizzare contemporaneamente tutte le possibili relazioni tra gli individui e il punto di divergenza tra due gruppi attraverso una rete. A differenza del semplice Neighbor - Joining si possono in questo modo considerare, mutazione, introgressione e migrazione.

Il primo Network, il Minimum Spanning Network (figura 42) è un albero che connette tutte le sequenze del campione senza creare reticolazioni e senza introdurre nuovi nodi, costruito in modo tale che la lunghezza totale dei rami

sia minima. Il secondo metodo, il median Joining (figura 43) deriva dal primo per aggiunta, seguendo un criterio parsimonioso, di alcuni *median vectors* (indicati dal nodo **mv** nella figura 43), che sono sequenze consenso costituite considerando una tripletta di sequenze alla volta. Vengono esclusi dal calcolo quei **mv** che hanno basse probabilità di apparire come nodi intermedi di un albero costruito con il metodo della massima parsimonia. Gli mv possono essere interpretati come la stima delle possibili sequenze non campionate o come sequenze ancestrali estinte.

L'analisi di questi due dendrogrammi porta in generale alle stesse conclusioni: l'aplogruppo B, è il cluster più esteso e rappresentato nelle razze ovine domestiche e anche nel ceppo merino.

Non ci sono evidenze per le quali si assegni una particolare razza di derivazione merino ad un aplogruppo differente, quanto più alcuni individui, forse a fronte dei numerosi incroci tra razze merino e con razze della zona del Caucaso e del medio oriente (per esempio l'Awassi e la Karacul) che possono aver così introdotto l'aplotipo A nella popolazione europea.

L'aplogruppo A (figura 42 - cerchio blu e figura 43 - cerchio verde), sembra essere in posizione intermedia tra l'aplogruppo B e gli aplogruppi D, E e C che rappresentano gli aplogruppi tipicamente asiatici, infatti, nessuna delle razze in studio vi si ritrova incluso.

Come già detto prima, alcuni individui di razza Sopravissana e Gentile di Puglia si situano in netta vicinanza con l'aplogruppo A (cerchi rossi in figura 42) come pure alcuni individui appartenenti alla razza Beira Baixa e Merino Precoce, anche se la maggior parte degli animali di queste ultime due, risultano del aplogruppo B. La Gentile di Puglia nella figura 43 mostra di avere qualche correlazione, anche con l'aplogruppo C, in base al vettore stimato che si viene a formare (GEN2-MBR1-**mva/mv3**-C).

Queste due osservazioni (tracce di aplogruppi asiatici in razze europee) sarebbe spiegato da alcuni autori mediante l'elevata introgressione del DNA mitocondriale, che conserverebbe le tracce di importazioni di animali dall'estero o delle antiche razze presenti in alcuni paesi europei, in seguito sostituite tramite l'incrocio da altre (Meadows *et al.* 2005).

In tabella 22 sono riportate infine le analisi della varianza molecolare secondo 5 classificazioni gerarchiche differenti.

Nelle prime 3 si è analizzata la variabilità raggruppando la razza Gentile di Puglia rispettivamente con l'aplogruppo B, A e D per valutare il livello di differenziazione di questa razza con i differenti cluster, in virtù della sua vicinanza agli aplogruppi asiatici, riscontrata con le analisi precedenti.

Nel primo caso (aplogruppo B e Gentile di Puglia), si è riscontrato che la percentuale di variazione è risultata statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra le razze del gruppo con un valore del 31,96%. Più elevata la percentuale di variazione (68%) nelle popolazioni, ovvero nei singoli individui. Un risultato praticamente sovrapponibile si è avuto quando si è analizzato il gruppo composto dall'aplogruppo A e la Gentile di Puglia (34% tra le razze e 65% nel totale) mentre una variazione minore tra le razze, 21,04% si è avuta analizzando l'aplogruppo D con la Gentile di Puglia ma una maggiore variazione, 78%, tra gli individui.

Nell'analisi della Gentile di Puglia contro il gruppo composto dell'aplogruppo A, D, C ed E si è avuta una percentuale di variazione del 55,96% tra i gruppi anche se il valore non è significativo mentre significativo il valore del -17,44% tra le popolazioni nei gruppi. Una percentuale negativa rispecchia, nel caso dell'AMOVA un'assenza di struttura genetica e questo è spiegabile col fatto che gli aplogruppi inclusi in questa gerarchia sono molto simili; la varianza va allora considerata alla stessa maniera di una correlazione.

Infine, dividendo tutte le razze di derivazione Merino per origine geografica si è ottenuto un valore non significativo del 14,19 nel caso della differenziazione tra gli aplogruppi e un valore leggermente superiore del 18,62 (sempre significativo) tra le razze nei gruppi. Un valore decisamente più elevato si è ottenuto nella differenziazione tra gli individui con un valore del 67,19% (non significativo).

In definitiva l'analisi della varianza attesta che la razza Gentile di Puglia risulta relazionata geneticamente in maniera intermedia tra l'aplogruppo B ed A come già visto nelle rappresentazioni precedenti. Invece sul campione totale non si nota alcuna differenziazione a livello raziale e della provenienza

geografica essendo i valori di queste gerarchie non elevati. Molto alta è risultata invece la differenziazione tra i singoli individui a testimoniare l'elevata *geneflow* all'interno della specie ovina come già descritto da numerosi autori (Meadows *et al.* 2005; Tapio *et al.* 2005).

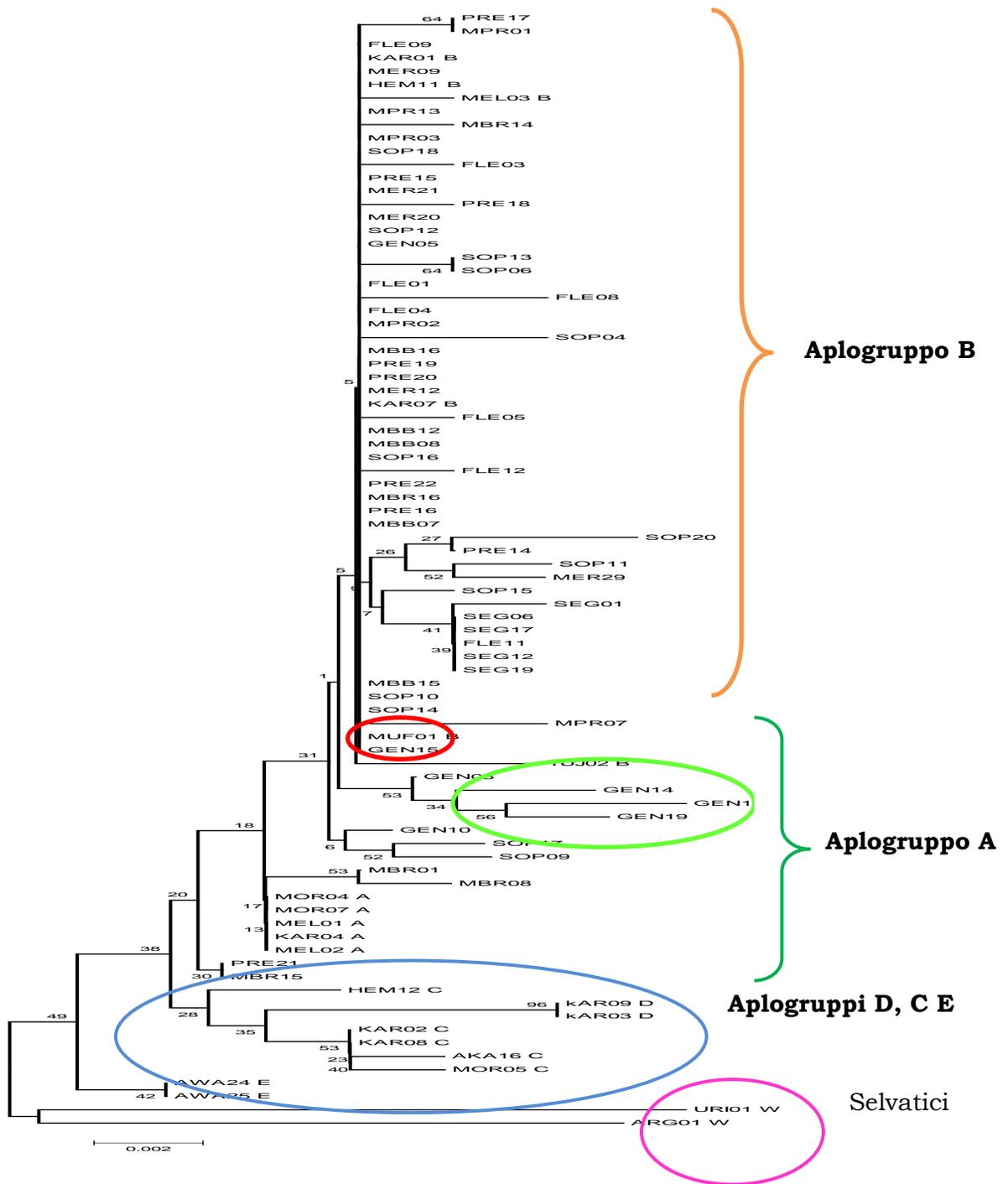


Figura 41: Neigor-Joining calcolato con il metodo p-distance.

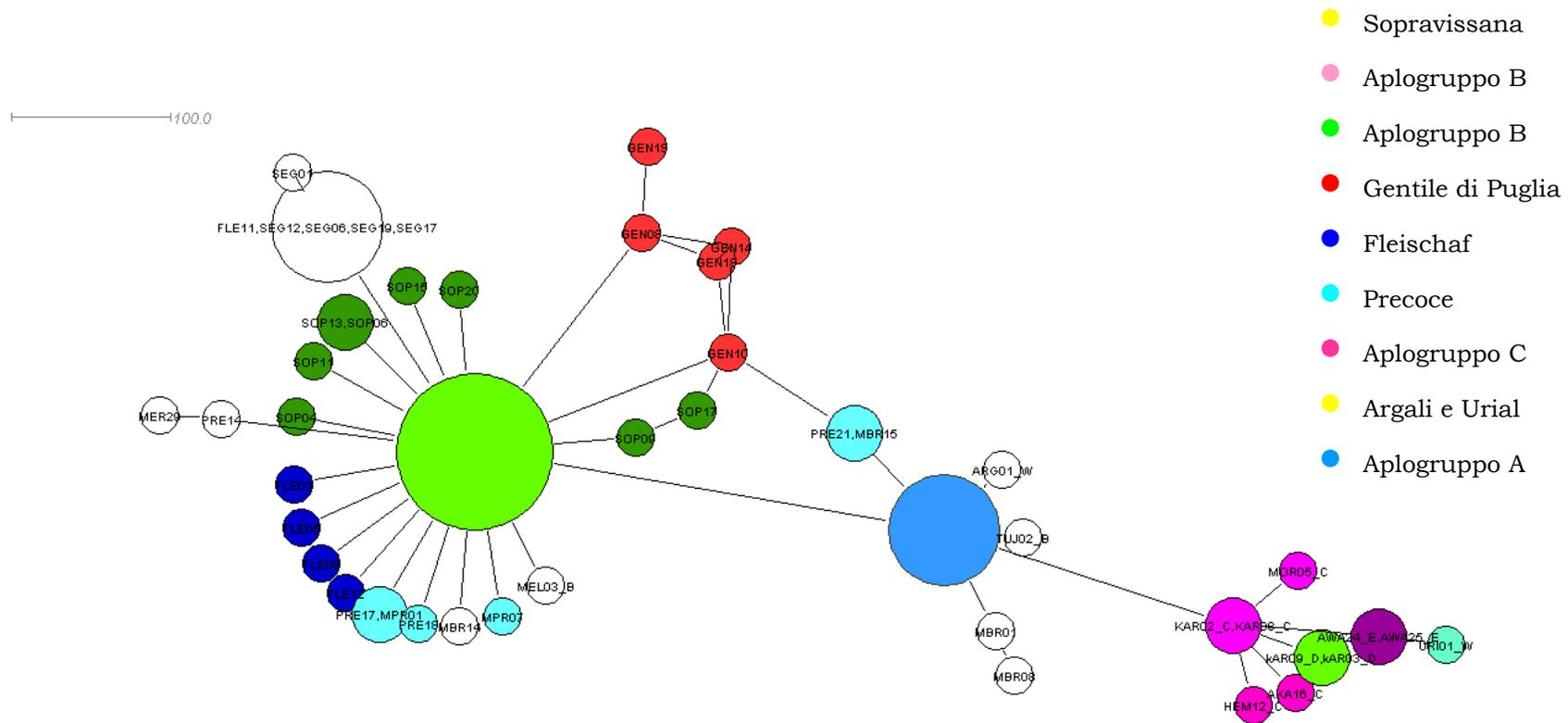


Figura 42: albero a rete calcolato secondo il metodo minimum spanning network.

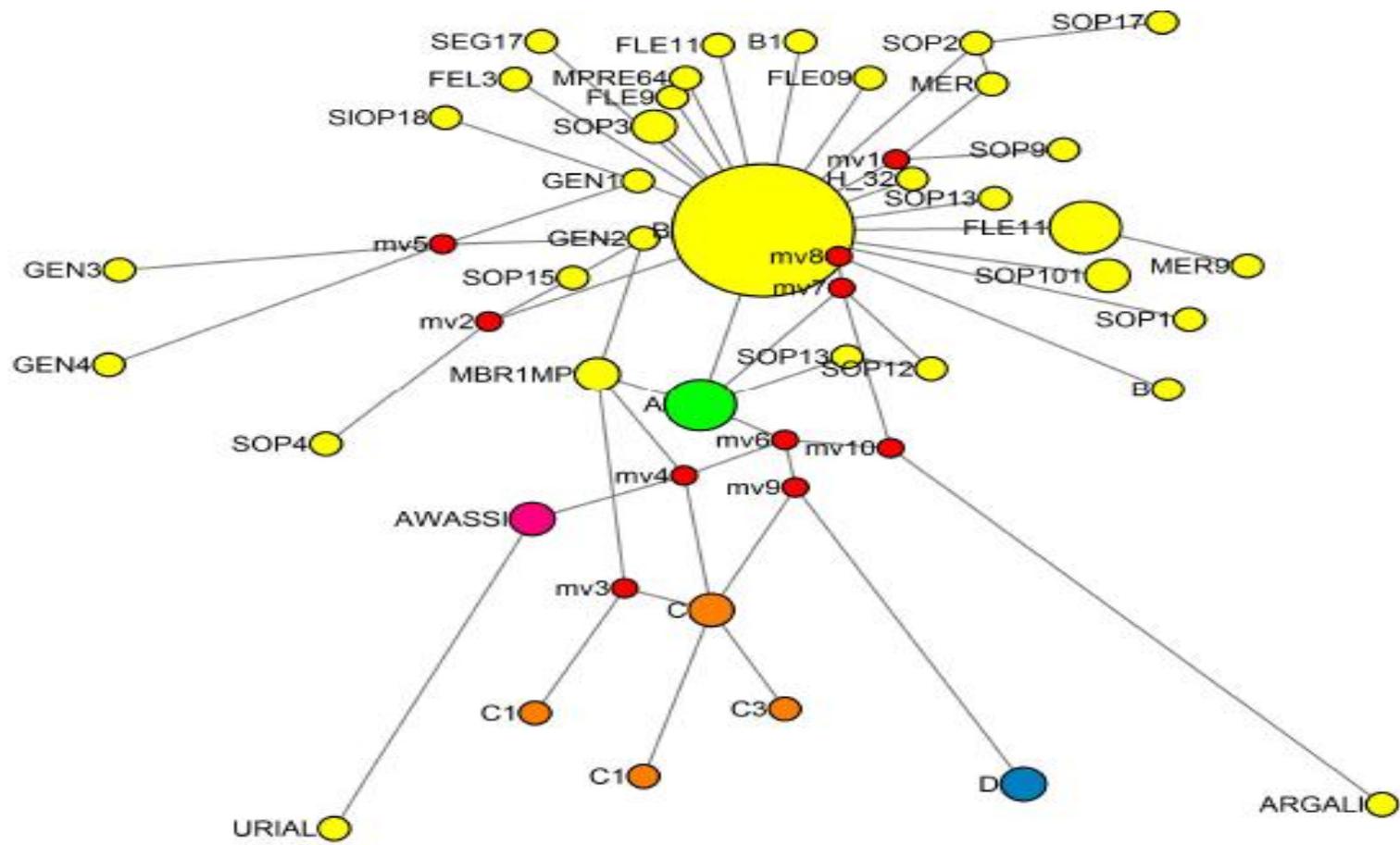


Figura 43: albero a rete calcolato secondo il metodo Median_Joining.

Analisi della varianza molecolare

Tabelle22: Analisi della varianza molecolare (AMOVA) secondo differenti gerarchie.

(*) significativo (per il livello vedi p-value);
ns=non significativo;

1. Gentile di Puglia e aplogruppo B

	Gradi di libertà	Devianza	Varianza	Percentuale di variazione
Tra le popolazioni	1	541,734	63,06122 Va	31,96*
Nelle popolazioni	11	2018,615	134,26190 Vb	68,04
Totale	12	1476,881	197,32313	

P-value =0,00196(*)

2. Gentile di Puglia con aplogruppo A

	Gradi di libertà	Devianza	Varianza	Percentuale di variazione
Tra le popolazioni	1	543,002	70,20188 Va	34,46*
Nelle popolazioni	10	1334,914	133,49143 Vb	65,54
Totale	11	1877,917	203,69331	

P-value =0,00098 (*)

3. Gentile di Puglia con aplogruppo D.

	Gradi di libertà	Devianza	Varianza	Percentuale di variazione
Tra le popolazioni	1	327,619	47,73761 Va	21,04 (ns)
Nelle popolazioni	7	1253,714	179,10204 Vb	78,96
Totale	8	1581,333	226,83965	

P-value= 0,06647

4. Gentile contro aplogruppi A, D, C ed E

	Gradi di libertà	Devianza	Varianza	Percentuale di variazione
Tra gruppi	2	956,768	76,40676 va	55,96 (ns)
Tra popolazioni nei gruppi	2	40,889	-23,80789 vb	-17,44 (*)
Tra le popolazioni	16	1342,914	83,93214 vc	61,47(*)
Totale	20	2340,571	136,53102	

P-value (Vc)= 0,00293

P-value (Vb)= 0,00391

P-value (Va)= 0,09580

5. Tutte le merinos divise per provenienza geografica

	Gradi di libertà	Devianza	Varianza	Percentuale di variazione
Tra gruppi	2	1317,775	18,92293 Va (ns)	14,19(*)
Tra popolazioni nei gruppi	6	1502,717	24,82567 Vb (*)	18,62(*)
Tra le popolazioni	53	4748,362	89,59174 Vc (ns)	67,19(ns)
Totale	61	7568,855	133,34034	

P-value(Vc)= 0,00000

P-value(Vb)= 0,00000

P-value (Va)= 0,05670

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dal presente lavoro sono risultati utili in differenti aspetti legati allo studio delle razze di derivazione Merino erupoe.

Le prime considerazioni riguardano aspetti prettamente tecnici:

- ✓ i marcatori microsatelliti si sono dimostrati utili nello studio delle dinamiche di popolazione e nello studio della diversità genetica;
- ✓ i microsatelliti potrebbero essere usati in protocollo di assegnazione e tracciabilità a livello europeo con un'alta affidabilità;
- ✓ risulta un'elevatissima differenziazione dovuta alla posizione geografica (paese di allevamento) e intra allevamento tra tutte le razze di derivazione Merino con eccezione di quelle con forte isolamento geografico (Rambouillet e Merino Portoghesi);
- ✓ il DNA mitocondriale si è dimostrato inefficace nello studio delle relazioni filogenetiche tra razze differenti in quanto risente in maniera elevata della *gene flow*, è invece utile ad indicare migrazioni di aplogruppi da zone geografiche differenti;
- ✓ la variabilità genetica del DNA mitocondriale è più elevata a livello individuale che tra razze o aplogruppi e in maniera più accentuata nelle razze europee.

Altre considerazioni riguardano aspetti di tipo demografico e storico:

- ✓ le razze ovine da carne in Europa, soprattutto se di derivazione merino sono il frutto di un intenso processo di selezione e incrocio tra tipi genetici differenti;
- ✓ durante il IX secolo le vicissitudini storiche delle società umane hanno influenzato fortemente l'introggressione tra le razze, quindi nel nostro continente la differenziazione è avvenuta più per isolamento geografico e deriva genetica che per origine filogenetica differente.

BIBLIOGRAFIA

- Ajmone-Marsan P., Negrini R., Crepaldi P., Milanese E., Gorni C., Valentini A. & Cicogna M. (2001) Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP® markers. *Animal Genetics* **32**, 281.
- Ajmone-Marsan P., Negrini R., Milanese E., Bozzi R., Nijman I.J., Buntjer J.B., Valentini A. & Lenstra J.A. (2002) Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by biallelic AFLP markers. *Animal Genetics* **33**, 280-6.
- Alvarez I., Royo L.J., Fernandez I., Gutierrez J.P., Gomez E. & Goyache F. (2004) Genetic relationships and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. *Journal of Animal Science* **82**, 2246-52.
- Alves B.C., Unanian M.M., Silva E., Oliveira M. & Moreira-Filho C.A. (2005) Use of RAPD markers for identifying Nelore bulls with early reproductive maturation onset. *Animal Reproduction Science* **85**, 183-91.
- Analla M., Montilla J.M. & Serradilla J.M. (1998) Analyses of lamb weight and ewe litter size in various lines of Spanish Merino sheep. *Small Ruminant Research* **29**, 255-9.
- Angier N. (1997) Sex and the female chimp. In: *The New York Times*, New York.
- Angier N. (2001) A fresh look at the straying ways of the female chimp. In: *The New York Times*, New York.
- Antoniou E., Gallagher D., Jr., Taylor J., Davis S., Womack J. & Grosz M. (2002) A comparative map of bovine chromosome 25 with human chromosomes 7 and 16. *Cytogenet Genome Res* **97**, 128-32.
- Arcos-Burgos M. & Muenke M. (2002) Genetics of population isolates. *Clinical Genetics* **61**, 233-47.
- Arruga M.V., Monteagudo L.V., Tejedor M.T., Barrao R. & Ponz R. (2001) Analysis of microsatellites and paternity testing in Rasa Aragonesa sheep. *Research in Veterinary Science* **70**, 271-3.
- B-Rao C. (2001) Sample Size Considerations in Genetic Polymorphism Studies. *Human Heredity* **52**, 191-200.
- Bachmann B., Luke W. & Hunsmann G. (1990) Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acid Research* **18**, 1309.
- Ballard J.W.O. (2000) When One Is Not Enough: Introgression of Mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* **17**, 1126-30.
- Balloux F. & Goudet J. (2002) Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Molecular Ecology* **11**, 771-83.
- Bamshad M., Wooding S., Salisbury B.A. & Stephens C. (2004) Deconstructing the relationship between genetics and race. *Nature Reviews Genetics* **5**, 598-609.
- Bamshad M. & Wooding S.P. (2003) Signatures of natural selection in the human genome. *Nature Reviews Genetics* **4**, 99-111.
- Bamshad M.J. & Olson S.E. (2003) Does race exist? *Scientific American* **289**, 78-85.

- Barbujani G. (2006) *L'invenzione delle razze*. Bompiani, Milano.
- Baron E.E., Martinez M.L., Verneque R.S. & Coutinho L.L. (2002) Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. *Genetics and Molecular Biology* **25**, 389-94.
- Baumung R., Cubric-Curik V., Schwend K., Achmann R. & Sölkner J. (2006) Genetic characterisation and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **123**, 265-71.
- Baumung R., Simianer H. & Hoffmann I. (2004) Genetic diversity studies in farm animals - a survey. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **121**, 361-73.
- Beale S.C. (1998) Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **70**, 279-300.
- Beckmann J.S. & Weber J. (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* **12**, 627-31.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (2003) Genetix: 4.05 Logiciel sous Windows™ pour la genétique des populations. . (ed. by Montpellier Ud). Laboratoire Genoma Populations, Interactions, Adaptations, Montpellier, France.
- Bergstrom C.T. & Pritchard J. (1998) Germline Bottlenecks and the Evolutionary Maintenance of Mitochondrial Genomes. *Genetics* **149**, 2135-46.
- Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L., Hawkins G.A., Toldo S.S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J. & Beattie C.W. (1994) A genetic linkage map for cattle. *Genetics* **136**, 619-39.
- Black W.C.I., Baer C.F., Antolin M.F. & DuTeau N.M. (2001) POPULATION GENOMICS: Genome-Wide Sampling of Insect Populations. *Annual Review of Entomology* **46**, 441-69.
- Blattman A.N. & Beh K.J. (1992) Dinucleotide repeat polymorphism within the ovine major histocompatibility complex. *Animal Genetics* **23**, 392.
- Bonin A., Bellemain E., Bronken Eidesen P., Pompanon F., Brochmann C. & Taberlet P. (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* **13**, 3261-73.
- Bonnet A., Thevenon S., Maudet F. & Maillard J.C. (2002) Efficiency of semi-automated fluorescent multiplex PCRs with 11 microsatellite markers for genetic studies of deer populations. *Animal Genetics* **33**, 343-50.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. & Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32**, 314-31.
- Bouzat J.L., Giovambattista G., Golijow C.D., Dulout F.N. & Lojo M.M. (1998) Conservation genetics of native breeds: the Argentine Creole Cattle. *Interciencia* **23**, 151-7.
- Bredbacka P. & Koskinen M.T. (1999) Microsatellite panels suggested for parentage testing in cattle: Informativeness revealed in Finnish Ayrshire and Holstein-Friesian populations. *Agricultural and Food Science in Finland* **8**, 233-7.
- Brezinsky L., Kemp S.J. & Teale A.J. (1993) Five polymorphic bovine microsatellites (ILSTS010-014). *Animal Genetics* **24**, 75-6.

- Broom J.E., Tate M.L. & Dodds K.G. (1996) Linkage mapping in sheep and deer identifies a conserved Pecora ruminant linkage group orthologous to two regions of HSA 16 and a portion of HSA7Q. *Genomics* **33**, 358-64.
- Brown T.A. (1999) *Genomes*. Bios Scientific Publisher, Manchester.
- Brown W.M., George M. & Wilson A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 1967-71.
- Brownstein M.J., Carpten J.D. & Smith J.R. (1996) Modulation of Non-Templated Nucleotide Addition by Taq DNA Polymerase: Primer Modifications that Facilitate Genotyping. *Biotechniques* **20**, 1004-10.
- Buchanan F.C. & Crawford A.M. (1992) Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF209 locus. *Animal Genetics* **23**, 183.
- Buchanan F.C. & Crawford A.M. (1993) Ovine microsatellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266 and OarFCB304 loci. *Animal Genetics* **24** 145.
- Buchanan F.C., Swarbrick P.A. & Crawford A.M. (1991) Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF65 locus. *Animal Genetic* **23**, 85-.
- Buntjer J.B., Otsen M., Nijman I.J., Kuiper M.T.R. & Lenstra J.A. (2002) Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting. *Heredity* **88**, 46.
- Buroker N.E., Brown J.R., Gilbert T.A., O'Hara P.J., Beckenbach A.T., Thomas W.K. & Smith M.J. (1990) Length Heteroplasmy of Sturgeon Mitochondrial DNA: An Illegitimate Elongation Model. *Genetics* **124**, 157-63.
- Calafell F., Roubinet F., Ramírez-Soriano A., Saitou N., Bertranpetit J. & Blancher A. (2008) Evolutionary dynamics of the human ABO gene. *Human Genetics* **124**, 123-35.
- Cardellino R. (2002) La estrategia mundial para los recursos genéticos. In: *V Congreso de SERGA*, Madrid, Spain.
- Cardellino R.A. (2003) Animal genetic resources conservation and development : the role of FAO. *Archivos de zootecnia* **52**, 185-92.
- Cavalli-Sforza L.L. & Bodmer W.F. (1971) *The genetics of human populations*, San Francisco, California.
- Cavalli-Sforza L.L. & Edwards W.F. (1967) Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* **19**, 233-57.
- Cavalli-Sforza L.L., Menozzi P. & Piazza A. (1994) *The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press.
- Cavalli Sforza L.L. (1996) *Geni, popoli e lingue*. Adelphi, Milano.
- Chamberlain J.S. & Chamberlain J.R. (1994) *Optimization of multiplex PCRs. The polymerase Chain Reaction*. Birkhauser, Boston.
- Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ranvier J.E. & Caskey C.T. (1990) Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (eds. by Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ), pp. 272-81. Academic Press, New York.
- Columella C.L. De re rustica. pp. 5-7.

- Crisà A., Marchitelli C., Savarese M.C. & Valentini A. (2003) Sequence analysis of myostatin promoter in cattle. *Cytogenetic and Genome Research* **102**, 48.
- Crown J.F. & Kimura M. (1970) *An introduction to Population Genetics*. Harper and Row, New York.
- Dallas J.F. (1992) Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome* **3**, 452-6.
- Davies K.P., Maddox J.F., Harrison B. & Drinkwater R. (1996) Ovine dinucleotide repeat polymorphism at eight anonymous loci. *Animal Genetics* **27**, 381-2.
- Davison A. & Chiba S. (2003) Laboratory temperature variation is a previously unrecognized source of genotyping error during capillary electrophoresis. *Molecular Ecology Notes* **3**, 321-3.
- De Gortari M.J., Freking B.A., Kappes S.M., Leymaster K.A., Crawford A.M., Stone R.T. & Beattie C.W. (1997) Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. *Animal Genetics* **28**, 274-90.
- Delgado J.V. (2002) Conservación de los recursos genéticos animales y los sistemas de explotación tradicionales dentro del programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. *Archivos de zootecnia* **51**, 15-23.
- Delgado J.V., Sierra A.C., Barajas F., Molina A., Rodero E. & Barba C. (1998) Evolución zootécnica del Merino Español en tiempos recientes y futuros. *Archivos de zootecnia*, 255-8.
- DeVuyst E.A., Bauer M.L., Cheng F.C., Mitchell J. & Larson D. (2008) The impact of a leptin gene SNP on beef calf weaning weights. *Animal Genetics* **39**, 284-6.
- Di Rienzo A., Peterson A.C., Garza J.C., Valdes A.M. & Slatkin M. (1994) Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3166-70.
- Di Stasio L. & Rolando A. (2005) A PCR-RFLP method for genotyping the myostatin locus in Piemontese cattle. *Animal Genetics* **36**, 521-.
- Diez-Tascón C., Littlejohn R.P., Almeida P.A.R. & M C.A. (2000) Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Animal Genetics* **31**, 243-51.
- Dillon M.C. & Wright J.M. (1993) Nucleotide sequence of the D-loop region of the sperm whale (*Physeter macrocephalus*) mitochondrial genome. *Mol Biol Evol* **10**, 296-305.
- Doda J.N., Wright C.T. & Clayton D.A. (1981) Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 6116-20.
- Douzery E.J.P. (1998) Evolutionary dynamics and phylogenetics of the mitochondrial control region of the Bovidae ruminants.
- Ede A.J., Pierson C.A. & M C.A. (1995) Ovine microsatellites at the OarCP34, OarCP38, OarCP43, OarCP49, OarCP73, OarCP79 and OarCP99 loci. *Anim. Genet* **26**, 129-31.

- Eding J.H. & Laval G. (1998) Measuring genetic uniqueness in livestock. In: *Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources* (ed. by Netherlands T), pp. 33-58.
- Edwards A., Civitello A., Hammond H.A. & Caskey C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics* **49**, 746-56.
- Ellegren H. (2000) Microsatellite mutations in the germline:: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* **16**, 551-8.
- Ellegren H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* **5**, 435-45.
- Ellegren H., Johansson M., Sandberg K. & Andersson L. (1992) Cloning of highly polymorphic microsatellite in the horse. *Animal Genetics* **23**, 133-42.
- Esteban M. (2004) *Razas Ganadera Española Ovinas*. Ministerio de Agricultura, Madrid.
- Estoup A., Tailliez C., Cornuet J.M. & Solignac M. (1995) Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution* **12**, 1074-84.
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-20.
- Excoffier L. & Heckel G. (2006) Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat Rev Genet* **7**, 745-58.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Excoffier L., Smouse P.E. & Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-91.
- Excoffier L. & Yang Z. (1999) Substitution rate variation among sites in mitochondrial hypervariable region I of humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **16**, 1357-68.
- Fajardo V., González I., López-Calleja I., Martín I., Rojas M., García T., Hernández P.E. & Martín R. (2007) PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat Science* **76**, 644-52.
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J.K. (2003) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* **164**, 1567-87.
- FAO Domestic Animal Diversity Information Service (DAD-IS).
- FAO (2004a) Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers. URL <http://www.fao.org/dad-is>.
- FAO (2004b) *Secondary Guidelines for development of natural farm animals genetic resources management plans: Measurement of domestic animal diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers*, Roma, Italy.

- Farnir F., Coppieters W., Arranz J.J., Berzi P., Cambisano N., Grisart B., Karim L., Marcq F., Moreau L., Mni M., Nezer C., Simon P., Vanmanshoven P., Wagenaar D. & Georges M. (2000) Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Research* **10**, 220-7.
- Felsenstein J. (2004) *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Ferreira M.Y. & Grattapaglia D. (1998) Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. In: *CENARGEN* (ed. by EMBRAPA), pp. 38-56, Brasilia, Brasil.
- Ford E.B. (1965) *Genetic Polymorphism*. Methusen, London.
- Foster M.W. & Sharp R.R. (2002) Race, Ethnicity, and Genomics: Social Classifications as Proxies of Biological Heterogeneity. *Genome Res.* **12**, 844-50.
- Geist V. (1991) On the taxonomy of giant sheep (*Ovis ammon* Linnaeus, 1766). *Canadian Journal of Zoology* **69**, 706-23.
- Gelfand D.H. (1989) *Taq DNA Polymerase. PCR technology: Principles and applications for DNA Amplification*. Stockton Press, New York.
- Georges M. & Massey J. (1992) Polymorphic DNA markers in bovidae. In: *WO Publication* (ed. by Org WIP), Geneva.
- Ginot F., Bordelais I., Nguyen S. & Gyapay G. (1996) Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. *Nucl. Acids Res.* **24**, 540-1.
- Giuffra E., Kijas J.M.H., Amarger V., Carlborg O., Jeon J.T. & Andersson L. (2000) The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. *Genetics* **154**, 1785-91.
- Gizaw S., Van Arendonk J.A.M., Komen H., Windig J.J. & Hanotte O. (2007) Population structure, genetic variation and morphological diversity in indigenous sheep of Ethiopia. *Animal Genetics* **38**, 621-8.
- Glaubitz J.C. (2004) convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes* **4**, 309-10.
- Glowatzki-Mullis M.L., Muntwyler J. & Gaillard C. (2007) Cost-effective parentage verification with 17-plex PCR for goats and 19-plex PCR for sheep. *Animal Genetics* **38**, 86-8.
- Goldstein D.B., Ruiz bares A., Cavalli-Sforza L.L. & Feldman M.W. (1995) An evaluation of genetic distances for use with microsatellite Loci. *Genetics* **139**, 463-71.
- Gomes I., Collins A., Lonjou C., Thomas N.S., Wilkinson J., Watson M. & Morton N. (1999) Hardy-Weinberg quality control. *Annales of Human Genetics* **63**, 535-8.
- Goodman M.M. (1973) Genetic distances: measuring dissimilarity among populations. *Yearbook of physical anthropology* **17**, 1-38.
- Gower J.C. (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**, 326-38.
- Gregorius H.R. (1974) Genetischer abstand zwischen populationen. I. Zur konzeption der genetischen abstandsmessung. *Silvae Genetica* **23**, 22-7.

- Grigaliunaite I., Tapio N., Viinalass H., Grislis Z., Kantanen J. & Miceikiene I. (2003) Microsatellite variation in the Baltic sheep breeds. *Veterinary Medicine and Zootechnics* **21**, 66-73.
- Gross D.S. & Garrad W.T. (1986) The ubiquitous potential z-forming sequence of eukaryotes (dT-dG)_n(dA-dC)_n is not detectable in the genomes of eubacteria, archaebacteria or mitochondria. *Molecular Cell Biology* **6**, 3010-3.
- Guo S.W. & Thompson E.A. (1992a) A Monte Carlo method for combined segregation and linkage analysis. *American Journal of Human Genetics* **51**, 1111-26.
- Guo S.W. & Thompson E.A. (1992b) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361 - 72.
- Ha J.M. & Chung H.Y. (2004) Haplotype analysis of ovine mt DNA for growth traits.
- Hamada H., Seidman M., Howard B.H. & Gordman C.M. (1984) Enhanced gene expression by the poly(dT-dG)poly(dA-dC) sequence. *Molecular Cell Biology* **4**, 2622-30.
- Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H. & Vogt P.H. (1997) Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *Biotechniques* **23**, 504-11.
- Herrnstein R.J. & Murray C. (1996) *Bell Curve: Intelligence and Class Structure in American Life*.
- Hideyoshi H. (1980) *L'arte della lana in Firenze nel basso Medioevo. Il commercio della lana e il mercato dei panni fiorentini nei secoli XIII-XV*. Leo S. Olschki, Firenze.
- Hiendleder S., Kaupe B., Wassmuth R. & Janke A. (2002) Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **269**, 893-904.
- Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R. & Janke A. (1998a) The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Domestic Sheep (*Ovis aries*) and Comparison with the Other Major Ovine Haplotype. *Journal of Molecular Evolution* **47**, 441-8.
- Hiendleder S., Mainz K., Plante Y. & Lewalski H. (1998b) Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: No evidence for contributions from urial and argali sheep. *Journal of Heredity* **89**, 113.
- Hintum T.J.L.v. (1994) Drowning in the genepool: managing genetic diversity in genebank collections. In: *Dept. Plant Breeding Research*. Univ. Agric. Sciences, Ultuna.
- Hoelzel A.R. & Bancroft D.R. (1992) *Molecular Genetic Analysis of Populations*. Oxford University Press, Oxford.
- Hoffman J.I. & Amos W. (2005) Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology* **14**, 599-612.
- Horst P. & Leucht W. Quality measurements in old and recent fine wool Merino breeds. URL <http://www.macauley.ac.uk/europeanfibre/effnnews1ph.htm>.

- Hulme D.J., Silk J.P., Redwin J.M., Barendse W. & Beh K.J. (1994) Ten polymorphic ovine microsatellites. *Animal Genetics* **25**, 434-5.
- Hundertmark K.J., Shields G.F., Udina I.G., Bowyer R.T., Danilkin A.A. & Schwartz C.C. (2002) Mitochondrial Phylogeography of Moose (*Alces alces*): Late Pleistocene Divergence and Population Expansion. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **22**, 375-87.
- Hunter R.L. & Market C.L. (1957) Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gel. *Science* **125**, 1294-5.
- Huson D.H. & Bryant D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* **23**, 254 - 67.
- Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K., Takeda H., Sugimoto M., Mizoguchi Y., Hirano T., Itoh T., Watanabe T., Reed K.M., Snelling W.M., Kappes S.M., Beattie C.W., Bennett G.L. & Sugimoto Y. (2004) A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res* **14**, 1987-98.
- Innis M.A., Myambo K.B., Gelfand D.H. & Brow M. (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 9436-40.
- ISAG International Society for Animal Genetics. URL <http://www.isag.org.uk/>.
- Jacob H.J., Lindpaintner K., Lincoln S.E., Kusumi K., Bunker R.K., Mao Y.P., Ganten D., Dzau V.J. & Lander E.S. (1991) Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* **67**, 213-24.
- Jamieson A. & Taylor S.C.S. (1997) Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* **28**, 397-400.
- Jeffreys A.J., Wilson V. & Thein S.L. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* **314**, 67-73.
- Joost S., Bonin A., Bruford M.W., Despres L., Conord C., Erhardt G. & Taberlet P. (2007) A spatial analysis method (SAM) to detect candidate loci for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation. *Molecular Ecology* **16**, 3955-69.
- Kalinowski S.T. (2002) How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* **88**, 62-5.
- Kalinowski S.T. (2005) Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity* **94**, 33-6.
- Kimura M. & Crow J.F. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**, 725-38.
- Kimura M. & Ohta T. (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 2868-72.
- King T.C. & Low R.L. (1987) Mapping of control elements in the displacement loop region of bovine mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* **262**, 6204-13.
- Klein J. (1920) *The Mesta: A Study in Spanish Economic History*.
- Kohn M.H. & Wayne R.K. (1997) Facts from feces revisited. *Trends Ecol. Evol* **12**, 223-7.

- Kossarek L.M., Grosse W.M., Finlay O. & McGraw R.A. (1993) Bovine dinucleotide repeat polymorphism RM006. *Journal of Animal Science* **71**, 3176.
- Kruglyak S., Durrett R.T., Schug M.D. & Aquadro C.F. (1998) Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10774-8.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M. (1994) MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* **10**, 189.
- Lai Y. & Sun F. (2003) The relationship between microsatellite slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 2123-31.
- Langella O. (1999) Population Genetic Software (Individuals or Populations Distances, Phylogenetic Trees) URL <http://www.bioinformatics.org/download.php?fileid=430>.
- Lawson Handley L.J., Byrne K., Santucci F., Townsend S., Taylor M., Bruford M.W. & Hewitt G.M. (2007) Genetic structure of European sheep breeds. *Heredity* **99**, 620-31.
- Lewontin R.C. (1972) *The apportionment of human diversity*. Appleton-Century-Crofts, New York.
- Li Y.-C., Korol A.B., Fahima T. & Nevo E. (2004) Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Mol Biol Evol* **21**, 991-1007.
- Lincoln S.E. & Lander E.S. (1992) Systematic detection of errors in genetic linkage data. *Genomics* **14**, 604-10.
- Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-15.
- Loftus R.T., David E., Machugh D.E., Bradley D.G., Sharp P.M. & Cunningham P. (1994) Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 2757-61.
- Luikart G., England P.R., Tallmon D., Jordan S. & Taberlet P. (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nat Rev Genet* **4**, 981-94.
- Luikart G., Gielly L., Excoffier L., Vigne J.D., Bouvet J.M. & Taberlet P. (2001) Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5927-32.
- MacHugh D.E., Shriver M.D., Loftus R.T., Cunningham P. & Bradley D.G. (1997) Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* **146**, 1071-86.
- Maddox J.F., Davies K.P., Crawford A.M., Hulme D.J., Vaiman D., Cribeu E.P., Freking B.A., Beh K.J., Cockett N.E., Kang N., Riffkin C.D., Drinkwater R., Moore S.S., Dodds K.G., Lumsden J.M., van Stijn T.C., Phua S.H., Adelson D.L., Burkin H.R., Broom J.E., Buitkamp J., Cambridge L., Cushwa W.T., Gerard E., Galloway S.M., Harrison B., Hawken R.J., Hiendleder S., Henry H.M., Medrano J.F., Paterson K.A., Schibler L.,

- Stone R.T. & van Hest B. (2001) An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Resources* **11**, 1275-89.
- Malyarchuk B., Rogozin I., Berikov V. & Derenko M. (2002) Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region. *Human Genetics* **111**, 46-53.
- Mannen H., Morimoto M. & Tsuji S. (2001) Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle.
- Mardis E. (2006) Anticipating the \$1,000 genome. *Genome Biology* **7**, 112.
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E. & Pemberton J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* **7**, 639 - 55.
- Martin P., Makepeace K., Hill S.A., Hood D.W. & Moxon E.R. (2005) Microsatellite instability regulates transcription factor binding and gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3800-4.
- Martinez M.A. (2001) Caracterización genética del cerdo Ibérico mediante marcadores moleculares. In: *Departamento de Genética*. University of Cordoba, Cordoba.
- Mason I.L. (1988) *World dictionary of livestock breeds*. C. A. B. International, Wallingford, UK.
- Mathews N.E. & Porter W.F. (1993) Effect of social structure on genetic structure of free-ranging white-tailed deer in the Adirondack Mountains. *Journal of Mammalogy* **74**, 33-43.
- Mayr E. (1942) *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia U.P, New York.
- Meadows J.R., Li K., Kantanen J., Tapio M., Sipos W., Pardeshi V., Gupta V., Calvo J.H., Whan V., Norris B. & Kijas J.W. (2005) Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *J Hered* **96**, 494 - 501.
- Meadows J.R.S., Cemal I., Karaca O., Gootwine E. & Kijas J. (2006) Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near east. *Genetics*, genetics.106.068353.
- Meadows J.R.S., Hawken R.J. & Kijas J.W. (2004) Nucleotide diversity on the ovine Y chromosome. *Animal Genetics* **35**, 379-85.
- Medina R.F., Barbosa P.F., Christman M. & Battisti A. (2006) Number of individuals and molecular markers to use in genetic differentiation studies. *Molecular Ecology Notes* **6**, 1010-3.
- Moioli B., Napolitano F., Orrù L. & Catillo G. (2006) Analysis of the genetic diversity between Gentile di Puglia, Sopravissana and Sarda sheep breeds using microsatellite markers. *ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE* **5**, 73-8.
- Moore S.S. & Byrne K. (1993) Dinucleotide polymorphism at the bovine calmodulin independent adenylcyclase locus. *Animal Genetics* **24**, 150.
- Moore S.S., Byrne K. & Malcolm N. (1997) Three cDNA-derived bovine dinucleotide repeat polymorphisms: CSSME069, CSSME070 and CSSME076. *Animal Genetics* **28**, 376-7.

- Moriyama E.N. & Powell J.R. (1997) Synonymous Substitution Rates in *Drosophila* : Mitochondrial Versus Nuclear Genes. *Journal of Molecular Evolution* **45**, 378-91.
- Mukesh M., Sodhi M. & Bhatia S. (2006) Microsatellite-based diversity analysis and genetic relationships of three Indian sheep breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **123**, 258-64.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Snikl R., Horn G.T. & Erlich H. (1986) Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* **51**, 263-73.
- Mullis K.B. (1992) The polymerase chain reaction in an anemic mode: How to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion. *PCR Methods and Applications* **1**, 1-4.
- Nadler C., Lay D.M. & Hassinger J.D. (1971) Cytogenetic analyses of wild sheep populations in northern Iran. *Cytogenetics* **10**, 137-52.
- Negrini G. (1989) La lunga storia delle razze merinizzate. *Informatore Zootecnico* **8**, 61-3.
- Negrini R., Milanese E., Bozzi R., Pellecchia M. & Ajmone-Marsan P. (2006) Tuscany autochthonous cattle breeds: an original genetic resource investigated by AFLP markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **123**, 10-6.
- Nei M. (1971) Identity of genes and genetic distance between populations. *Genetics* **68**, 47.
- Nei M. (1972) Genetic distances between populations. *The American Naturalist* **106**, 283.
- Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.*, pp. 3321-3.
- Nei M. (1975) *Molecular population genetics and evolution*, North-Holland, Amsterdam and New York.
- Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-90.
- Nei M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei M. & Kumar S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Inc., New York, U.S.A.
- Nei M. & Maruyama T. (1975) Letters to the editors: Lewontin-Krakauer test for neutral genes. *Genetics* **80**, 395.
- Nei M., Tajima F. & Taten Y. (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* **19**, 153-70.
- Nordheim A. & Rich A. (1983) The sequence (dC-dA)_n(dG-dT)_n forms left-handed z-DNA in negatively supercoiled plasmids. *Proceedings of the National Academy of the Sciences* **80**, 1821-5.
- O'Hanlon P.C. & Peakall R. (2000) A Simple method for the detection of size homoplasy among amplified fragment length polymorphism fragments. *Molecular Ecology* **9**, 815-6.
- Ochman H., Jones J.S. & Selander R.K. (1983) Molecular area effects in *Cepaea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 4189-93.

- Oda S., Oki E., Maehara Y. & Sugimachi K. (1997) Precise assessment of microsatellite instability using high resolution fluorescent microsatellite analysis. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3415-20.
- Page R.D.M. (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-8.
- Pariset L., Cappuccio I., Ajmone-Marsan P., Bruford M., Dunner S., Cortes O., Erhardt G., Prinzenberg E.-M., Gutscher K., Joost S., Pinto-Juma G., Nijman I.J., Lenstra J.A., Perez T., Valentini A. & Econogene t.C. (2006) Characterization of 37 Breed-Specific Single-Nucleotide Polymorphisms in Sheep. *Journal of Heredity* **97**, 531-4.
- Park S.D.E. (2001) Trypanotolerance in west african cattle and the population genetics effects of selection. University of Dublin, Dublin, Ireland.
- Peakall R., Gilmore S., Keys W., Morgante M. & Rafalski A. (1998) Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology & Evolution* **15**, 1275-87.
- Pedrosa S., Arranz J.-J., Brito N., Molina A., San Primitivo F. & Bayón Y. (2007) Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep. *Sel. Evol.* **39**, 91-103.
- Pedrosa S., Uzun M., Arranz J.-J., Gutiérrez-Gil B., San Primitivo F. & Bayón Y. (2005) Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**, 2211-7.
- Penny D., Steel M., Waddell P.J. & Hendy M.D. (1995) Improved analyses of human mtDNA sequences support a recent African origin for *Homo sapiens*. *Mol Biol Evol* **12**, 863-82.
- Penty J.M., Henry H.M., Ede A.J. & Crawford A.M. (1993) Ovine microsatellites at the OarAE16, OarAE54, OarAE57, OarAE119 and OarAE129 loci. *Animal Genetics* **24**, 219.
- Perezgrovas R. (2003) El borrego Chiapas criollo: Una historia de vellones, mercados mundiales y mujeres de polleras de lana. *Biodiversidad* **37**, 19-21.
- Peter C., Bruford M., Perez T., Dalamitra S., Hewitt G. & Erhardt G. (2007) Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Animal Genetics* **38**, 37-44.
- Peter C., Erhardt G., Hewitt G., Dalamitra S., Bruford M., Perez T. & Consortium E. (2005a) Microsatellite markers reveal differentiation of southeastern and western european sheep breeds. In: *THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY*, pp. 199-200, Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005.
- Peter C., Prinzenberg E.M., Erhardt G. & Econogene (2005b) Null allele at the OarAE129locus and corresponding allele frequencies in German sheep breeds. *Animal Genetics* **36**, 92.
- Petit E., Balloux F. & Goudet J. (2001) Sex-biased dispersal in a migratory bat: a characterization using sex-specific demographic parameters. *Evolution* **55**, 635-40.

- Pierson C.A., Hanrahan V., Ede A.J. & Crawford A.M. (1993) Ovine microsatellites at the OarVH34, OarVH41, OarVH58, OarVH61 and OarVH72 loci. *Animal Genetics* **24**, 224.
- Pollidori P., Panella F. & Morbidini L. (1989) Indagine conoscitiva sulla situazione delle razze ovine merinizzate. *Economia Montana* **4**.
- Pompanon F., Bonin A., Bellemain E. & Taberlet P. (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* **6**, 847-59.
- Pranisha B. (2004) Genetic characterization of southern african sheep breeds using DNA markers. In: *Department of Animal, Wildlife and Grassland Sciences*. University of the Free State, Bloemfontein.
- Presson A.P., Sobel E., Lange K. & Papp J.C. (2006) Merging Microsatellite Data. *Journal of Computational Biology* **13**, 1131-47.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* **155**, 945-59.
- Quiroz V.J. (2007) Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos. In: *Departamento de Genética*. University of Cordoba, Cordoba.
- Recensamento Geral de gados (1970), Lisboa.
- Reed C. (1960) *A review of the archaeological evidence on animal domestication in the prehistoric Near East*. In *Prehistoric investigations in Iraqi Kurdistan, studies in ancient Oriental civilization*. University of Chicago.
- Reynolds J., Weir B.S. & Cockerham C. (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics Society of America* **105**, 767-79.
- Richard M. & Thorpe R.S. (2001) Can microsatellites be used to infer phylogenies? evidence from population affinities of the Western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**, 351-60.
- Rogers J.S. (1972) *Measures of genetic similarity and genetic distance*. *Studies in genetics VII*. University of Texas Publications.
- Roosen J., Fadlaoui A. & Bertaglia M. (2005) Economic evaluation for conservation of farm animal genetic resources. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **122**, 217-28.
- Rousset F. (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-6.
- Rozas J. & Rozas R. (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* **15**, 174.
- Rozen S. & Skaletsky H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Methods in Molecular Biology*. (ed. by Krawetz S MS), pp. 365-86. Humana Press, Totowa, NJ.
- Ruane J. (1999) A critical review of the value of genetic distance studies in conservation of animal genetic resources. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **116**, 317-23.
- Ryder M.L. (1984) *Evolution of domesticated animals*. Longman, London and New York.
- Saccone C., Lanave C., Pesole G. & Sbisà E. (1993) Peculiar features and evolution of mitochondrial genome in mammals. In: *Mitochondrial DNA*

- in *Human Pathology* (ed. by Wallace SDMaD), pp. 27-37. Raven Press, New York.
- Saitou N. & Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-25.
- Sanchèz A.B. (1986) *Merinos precoces y razas afines en España*. Asociacion Española de criadores de ovinos precoces, Madrid.
- SanCristobal M., Chevalet C., Haley C.S., Joosten R., Rattink A.P., Harlizius B., Groenen M.A.M., Amigues Y., Boscher M.Y., Russell G., Law A., Davoli R., Russo V., Desautes C., Alderson L., Fimland E., Bagga M., Delgado J.V., Vega-Pla J.L., Martinez A.M., Ramos M., Glodek P., Meyer J.N., Gandini G.C., Matassino D., Plastow G.S., Siggens K.W., Laval G., Archibald A.L., Milan D., Hammond K. & Cardellino R. (2006) Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics* **37**, 189-98.
- Sarti D.M. (1996) Le razze derivate Merinos ad attitudine carne nel centro-sud europeo. *L'Allevatore di Ovini e Caprini* **7/8**, 1-2.
- Sarti D.M., Panella F., Pauselli M., Sarti F.M. & Lasagna E. (2002) L'allevamento degli ovini. *Il divulgatore*.
- Sbisà E., Tanzariello F., Reyes A., G P. & Saccone C. (1997) Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* **205**, 125-40.
- Schlotterer C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**, 365-71.
- Schlotterer C. & Tautz D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acid Research* **20**, 211-5.
- Schneider S., Roessli D. & Excoffier L. (2000) Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis.
- Shinde D., Lai Y., Sun F. & Arnheim N. (2003) Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acid Research* **31**, 974-80.
- Sneath P.H.a. & Sokal R.R. (1973) *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman, San Francisco, CA.
- Sobel E., Papp J.C. & Lange K. (2002) Detection and integration of genotyping errors in statistical genetics. *American Journal of Human Genetics* **70**, 496-508.
- Sobral M., Antero C., Borrego J. & Domingos A. (1991) *Recursos Genéticos. Raças Autoctones. Espécies Ovina E Caprina*. Associação de criadores de ovinos do sul, Portugal.
- Solinas Toldo S., Fries R., Steffen P., Neiberghs H.L., Barendse W., Womack J.E., Hetzel D.J. & Stranzinger G. (1993) Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mammalian Genome* **4**, 720-7.
- Sønstebo J.H., Borgstrøm R. & Heun M. (2007) A comparison of AFLPs and microsatellites to identify the population structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Hardangervidda, Norway. *Molecular Ecology* **16**, 1427-38.

- Spritze A.L., Egito A.A., Mariante A.S. & McManus C. (2003) Caracterizaco genetica da raca bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **38**, 1157 - 64.
- Sreenu V., Kumar P., Nagaraju J. & Nagarajaram H. (2006) Microsatellite polymorphism across the *M. tuberculosis* and *M. bovis* genomes: Implications on genome evolution and plasticity. *Bmc Genomics* **7**, 78.
- Sreenu V.B., Kumar P., Nagaraju J. & Nagarajaram H.A. (2007) Simple sequence repeats in mycobacterial genomes. *Journal of Biosciences* **32**, 3-15.
- Steffen P., Eggen A., Dietz A.B., Womack J.E., Stranzinger G. & Fries R. (1993) Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics* **24**, 121-4.
- Storz J.F. (2005) Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology* **14**, 671-88.
- Strabone. Geografia. pp. 4-15.
- Strachan T. & Read A.P. (1996) *Human Molecular Genetics*. Bios scientific publishers, Oxford.
- Strand M., Prolla T.A., Liskay R.M. & Petes T.D. (1993) Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**, 274-6.
- Sturzeneker R., Haddad L.A., Bevilacqua R.A.U., Simpson A.J.G. & Pena S.D.J. (1998) Polarity of mutations in tumor-associated microsatellite instability. *Human Genetics* **102**, 231-5.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P. & Bouvet J. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucl. Acids Res.* **24**, 3189-94.
- Taberlet P., Waits L.P. & Luikart G. (1999) Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 323-7.
- Talle S.B., Chenyabuga W.S., Fimland E., Syrstad O., Meuwissen T. & Klungland H. (2005) Use of DNA technologies for the conservation of animal genetic resources: A review. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science* **55**, 1-8.
- Tapio M., Marzanov N., Ozerov M., Cinkulov M., Gonzarenko G., Kiselyova T., Murawski M., Viinalass H. & Kantanen J. (2006) Sheep Mitochondrial DNA Variation in European, Caucasian, and Central Asian Areas. *Mol Biol Evol* **23**, 1776-83.
- Tapio M., Tapio I., Grislis Z., Holm L.E., Jeppsson S., Kantanen J., Miceikiene I., Olsaker I., Viinalass H. & Eythorsdottir E. (2005) Native breeds demonstrate high contributions to the molecular variation in northern European sheep. *Molecular Ecology* **14**, 3951-63.
- Tapio N., Miceikiene I., Vilkki J. & Kantanen J. (2003) Comparison of microsatellite and blood protein diversity in sheep: inconsistencies in fragmented breeds. *Molecular Ecology* **12**, 2045-56.
- Tautz D. & Renz M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucaryotic genomes. *Nucleic Acid Research* **12**, 4127-238.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

- weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673 - 80.
- Tilman D. (2000) Causes, consequences and ethics of Biodiversity. *Nature* **405**, 208-11.
- Tortorelli N. (1984) *Zootecnica speciale*. Edagricole, Bologna.
- Toth G., Gaspari Z. & Jurka J. (2000) Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Res.* **10**, 967-81.
- Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi K., Eggen A., Ciampolini R., Lépingle A., Velmala R., Kaukinen J., Varvio S.L., Martin P., Levéziel H. & Guérin G. (1994) A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome* **5**, 288-97.
- Valdez R., Nadler C.F. & Bunch T.D. (1978) Evolution of wild sheep in Iran. *Evolution*, 56-72.
- Valière N. & Taberlet P. (2000) Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology* **9**, 2150-2.
- Vekemans X., Beauwens T., Lemaire M. & Roldan-Ruiz I. (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* **11**, 139-51.
- Vigne J.D. (1999) *The large 'true' Mediterranean islands as a model for the Holocene human impact on the European vertebrate fauna? Recent data and new reflections.*, Rahden, Westfalia.
- Vila C., Leonard J.A., Gotherstrom A., Marklund S., Sandberg K., Liden K., Wayne R.K. & Ellegren H. (2001) Widespread Origins of Domestic Horse Lineages. *Science* **291**, 474-7.
- Walberg M.W. & Clayton D.A. (1981) Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research* **24**, 5411-21.
- Walsh P.S., Erlich H.A. & Higuchi R. (1992) Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR Methods and Applications* **1**, 241-50.
- Wan C.Y. & Wilkins T.A. (1993) Spermidine facilitates PCR amplification of target DNA. *PCR Methods and Applications* **3**, 208-10.
- Weir B.S. (1996) *Genetic data analysis II*. Sinauer Ed. Sunderland.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358 - 70.
- Whittaker J.C., Harbord R.M., Boxall N., Mackay I., Dawson G. & Sibly R.M. (2003) Likelihood-Based Estimation of Microsatellite Mutation Rates. *Genetics* **164**, 781-7.
- Wickham B.W. & Banos G. (1998) Impact of international evaluations on dairy cattle breeding programmes. In: *Proceedings of Sixth World Congress on Genetics applied to Livestock Production*, pp. 315-22, Armidale, Australia.
- Wikipedia. URL <http://it.wikipedia.org/wiki/>.
- Wilding C.S., Butlin R.K. & Grahame J. (2001) Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 611-9.

- Williams G.J.K., Kubelik A.R., Livak J., Rafalski J.A. & Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* **18**, 6531-5.
- Wiparati P.J. (2003) An automated allele-calling system for high-throughput microsatellite genotyping. In: *Department of medical Biology*. University of Melbourne, Melbourne.
- Wright S. (1951) The genetic structure of populations. *Ann. Eugenics* **15**, 323.
- Wright S. (1965) Interpretation of populations structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* **19**, 395-420.
- Wright S. (1969) Evolution and the Genetics of Populations. In: *The Theory of Gene Frequencies* (University of Chicago Press, Chicago).
- Wu C., Zhang Y., Bunch T., Wang S. & Wang W. (2003) Mitochondrial control region sequence variation within the argali wild sheep (*Ovis ammon*): evolution and conservation relevance. *Mammalia* **1**, 109-18.
- Xu X., Peng M., Fang Z. & Xu X. (2000) The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature Genetics* **24**, 396-9.
- Zardoya R., Garrido Pertierra A., Bautista J.M., Villalta M., López-Pérez M.J. & Montoya J. (1995) Nucleotide sequence of the sheep mitochondrial DNA D-loop and its flanking tRNA genes. *Current Genetics* **28**, 94-6.
- Zeuner F.E. (1963) *A history of domesticated animals*, London