



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA
FACOLTÀ DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA VEGETALE E BIOTECNOLOGIE
AGROAMBIENTALI E ZOOTECHNICHE

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN SCIENZE E TECNOLOGIE
DELLE PRODUZIONI ANIMALI

TESI DI LAUREA

**“VARIABILITÀ GENETICA TRA LE RAZZE
GENTILE DI PUGLIA, SOPRAVISSANA E
MERINO SPAGNOLA MEDIANTE LO STUDIO
DEL DNA MITOCONDRIALE.”**

Il Laureando
Emanuela Tullo

Il Relatore
Prof.ssa Francesca Sarti

Co-Relatore
Dr. Vincenzo Landi

Anno Accademico 2006-2007

La presente Tesi di Laurea è stata svolta in collaborazione con il laboratorio di “Biología Molecùlar Aplicada” dell’Università di Cordoba (Spagna) e con il “Laboratorio de Investigación Aplicada” del sevizio “de cría Caballar y Remonta” del Ministerio della Difesa Spagnolo.



Ai miei nonni Maria ed Emanuele

INDICE

INDICE	1
1 INTRODUZIONE	3
1.1 BIOLOGIA DEI MITOCONDRI	3
1.1.1 Teoria evolutiva dei mitocondri	4
1.1.2 Il genoma mitocondriale	4
Meccanismo di eredità.....	9
Ricombinazione.....	9
Numero di introni.....	10
Dimensione effettiva della popolazione (N_e)	10
Tasso di mutazione	11
1.1.3 Il genoma mitocondriale ovino	15
1.2 DNA MITOCONDRIALE E FILOGENIA	19
1.2.1 Cenni storici	19
1.2.2 Filogenia e metodi di indagine	20
Coalescenza	21
Introggressione	22
1.2.3 Origine della pecora domestica	24
1.3 LA RAZZA MERINOS	27
1.3.1 La Merinos nel mondo	28

1.3.2 La Merinos in Italia	29
La razza Sopravissana.....	29
La razza Gentile di Puglia	30
2 SCOPO DELLA TESI	32
3 MATERIALI E METODI	33
3.1 Il campionamento	33
3.2 Estrazione del DNA totale	35
3.3 Disegno dei primer.....	35
3.4 Amplificazione della Regione di Controllo	39
3.5 Sequenziamento dei prodotti	40
3.5.1 Purificazione della reazione di PCR.....	40
3.5.2 Reazione di sequenziamento	41
3.5.3 Elettroforesi dei prodotti di sequenziamento.	42
3.6 Analisi statistica	43
4 RISULTATI E DISCUSSIONE	44
5 CONCLUSIONI	50
BIBLIOGRAFIA.....	62
RINGRAZIAMENTI	71

1 INTRODUZIONE

1.1 BIOLOGIA DEI MITOCONDRI

Le principali attività metaboliche aerobiche della cellula eucariota sono svolte dai mitocondri, i polmoni della cellula. In questi organuli hanno luogo tutte le reazioni di produzione di ATP partendo dall'ossidazione dei glucidi e dei lipidi.

Il mitocondrio è avvolto in una doppia membrana separata da uno spazio intermedio, e la membrana interna forma numerose pliche, dette creste che si estendono fino all'interno dell'organulo, definito matrice, all'interno della quale sono presenti il cromosoma mitocondriale e gli enzimi responsabili delle reazioni del metabolismo ossidativo.

Le fonti principali di energia per la produzione di ATP sono forniti dal glucosio e dagli acidi grassi; il primo entra nel mitocondrio sotto forma di piruvato che viene ossidato ad Acetil-CoA, e la sua successiva degradazione attraverso il ciclo dell'acido citrico a CO_2 produce la maggior parte dell'energia utilizzabile (ATP), mentre gli altri entrano inalterati all'interno del mitocondrio e vengono metabolizzati anch'essi ad Acetil-CoA, la cui ossidazione è accoppiata alla riduzione di NAD^+ e FAD a NADH e FADH_2 .

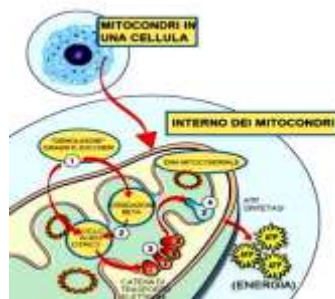


Figura 1. Schema del mitocondrio

1.1.1 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 risultò benefica e col tempo portò i genomi dei batteri ad 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 a partire dal quale si originò il sistema genetico dei mitocondri attuali.

1.1.2 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 per organulo, le dimensioni variano a seconda della specie, infatti, il genoma mitocondriale umano e quello della maggior parte degli animali è

di 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 dal genoma nucleare per le dimensioni, è costituito da circa 3 miliardi di pb, per la ploidia (la ploidia è il numero di cromosomi omologhi in una cellula), meccanismo ereditario, grado di ricombinazione, numero di introni, numero effettivo di popolazione, 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 ancestrale.

Il genoma mitocondriale codifica attraverso 37 geni, 13 proteine implicate nel trasporto di elettroni e nella fosforilazione ossidativa, 2 RNA ribosomiali (RNAr 16S e 12S) e 22 RNA transfer (RNAt) che servono per la traduzione delle proteine codificate dal genoma dell'organulo.

I 37 geni non presentano introni, mostrano zone di sovrapposizione e possono essere contigui o separati da uno o due codoni.

Il piccolo numero di RNAt 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 20 aminoacidi incorporati nelle proteine e 3 sono codoni terminali e sono necessari almeno 30 RNAt diversi.

Il DNA mitocondriale umano, invece codifica solo 22 tipi di RNAt, che sono quindi gli unici utilizzabili per la traduzione degli RNA messaggero (RNAm) mitocondriale, e questo comporta una forma diversa di appaiamento in cui la U nell'anticodone dell' RNAt si può accoppiare con qualunque delle quattro basi nella terza posizione del codone dell' RNAm , facendo sì che un unico RNA-t riconosca 4 codoni.

Perlopiù nei mitocondri alcuni codoni codificano aminoacidi distinti dal codice "universale".

Il genoma mitocondriale è estremamente 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 (hypervariabile 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 un bolla o "loop" e il termine regione

ipervariabile viene utilizzato a causa della presenza di mutazioni puntiformi che si verificano con una frequenza 10 volte maggiore rispetto a quella del DNA nucleare.

Questa struttura principale non codificante è creata dalla 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 altamente 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 (Sbisà *et al.*, 1997);

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 che fosse coinvolta nella genesi dei 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 negli umani, in cui ha contribuito notevolmente nel fare luce sull'origine dell'uomo moderno (Kriings *et al.* 1997, 1999; Excoffier e 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.*, 1991; Sbisà *et al.*, 1997; Pesole *et al.*, 1999).

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

Visto che quasi tutti i mitocondri dell'ovulo fecondato sono apportati dall'ovocita invece che dallo spermatozoo, le mutazioni germinali nel MtDNA sono trasmesse alla generazione seguente dalla madre.

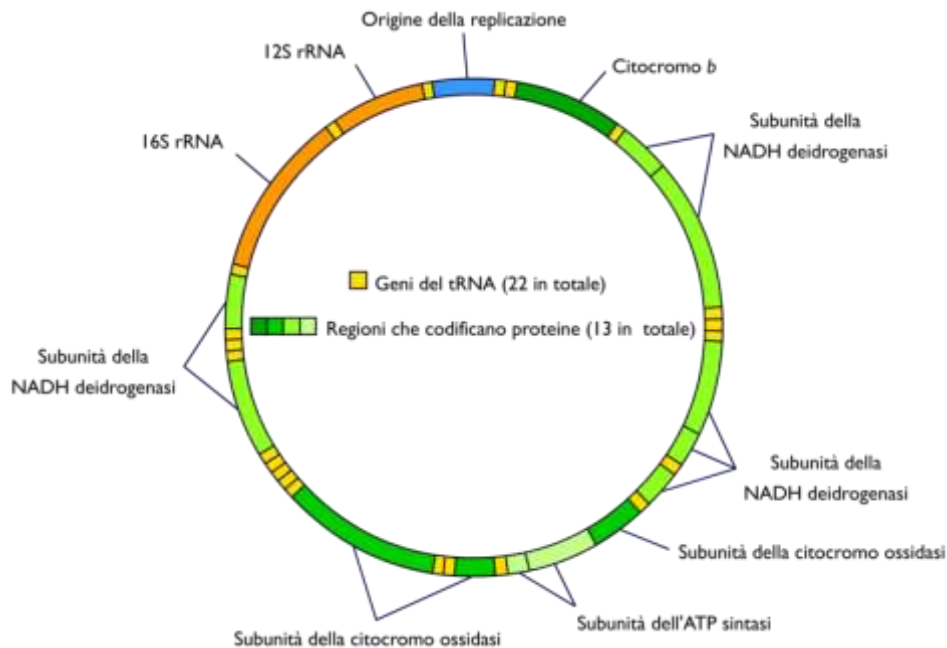


Figura 2. Schema del DNA mitocondriale

Meccanismo di eredità

Il DNA mitocondriale viene ereditato per via materna, in quanto i mitocondri paterni, presenti nella coda dello spermatozoo, vengono persi nel momento della fusione dei due pronuclei.

Ricombinazione

Per ricombinazione genetica si intende ogni processo attraverso il quale, a partire da un genotipo, si ottengono nuove combinazioni di alleli rispetto a quelle iniziali e di solito il DNA mitocondriale animale non è soggetto a questo fenomeno.

Questa situazione può essere molto utile per usi filogenetici, in quanto molti metodi di ricostruzione filogenetica partono dal presupposto che non ci sia ricombinazione.

Numero di introni

Si definiscono introni le regioni non codificanti di un gene (eucariotico o di archeobatteri) che, insieme agli esoni, vengono trascritte dalle RNA polimerasi.

Mentre nel DNA nucleare gli introni sono presenti in tutti i geni, nel DNA mitocondriale questi sono assenti

Dimensione effettiva della popolazione (N_e)

Il DNA mitocondriale è aploide ed ereditato per via materna, e questo significa che per ogni copia di DNA mitocondriale che passa da una generazione all'altra, passano 4 copie di DNA nucleare.

Visto che il numero effettivo popolazionale N_e , cioè la consistenza calcolata in base alla diversità genetica effettiva, è espressa in numero di individui, il N_e mitocondriale è approssimativamente la metà del N_e nucleare, anche se l'effettivo numero di alleli è ridotto ad $\frac{1}{4}$ di quello nucleare e questo significa che il DNA mitocondriale fissa nuovi alleli più velocemente del DNA nucleare.

Il N_e è influenzato non solo dal numero dei genomi di una popolazione, ma anche dal successo riproduttivo di questi.

Per esempio, se i sessi presentano differenze nella varianza del successo riproduttivo, come nel caso di animali poligami, dove solo alcuni maschi hanno molto più successo di altri, il N_e autosomico è molto più piccolo rispetto alla consistenza della

popolazione, ed è calcolato come
$$N_e = \frac{4MF}{M + F}$$
 dove M e F sono il numero effettivo di maschi e femmine nella popolazione.

Se il numero effettivo di maschi in una popolazione è meno di $\frac{1}{7}$ delle femmine, il tasso di deriva è più alto di quello mitocondriale. Questo tasso è plausibile in quelle specie con una forte selezione sessuale.

La differenza tra N_e mitocondriale e N_e nucleare è ulteriormente complicata dal fatto che il DNA mitocondriale è formato da una singola molecola linked con bassa o assente ricombinazione.

Questo significa che ogni passaggio selettivo, come la fissazione di aplotipi positivi rispetto ad altri sfavorevoli o la riduzione delle dimensioni effettive della popolazione dovute alla purificazione della popolazione da varianti a bassa fitness, può essere utile nel determinare il tasso apparente di deriva genetica.

Tasso di mutazione

Per tasso di mutazione si fa riferimento alla differenza tra la sequenza di un individuo e quella di sua madre.

Ci sono tre tassi di mutazione da prendere in considerazione:

Tasso di mutazione per individuo per generazione (u), stimato con gli studi di pedigree;

Tasso di sostituzione (k_s) per il quale un certo allele diventa fisso in una popolazione .

Tasso di mutazione lungo la linea ancestrale (k_a), ottenuto scegliendo un individuo e tracciando la sua ascendenza a ritroso indefinitamente nel tempo, e rappresenta la velocità al quale si osservano gli eventi mutazionali.

C'è una correlazione tra u e gli studi di filogenia, attraverso l'ipotesi dell'orologio molecolare, in cui sotto condizioni neutrali viene assunto che $k_a = u$, anche se in generale non è vero, ma si verifica solo quando u è piccolo rispetto all'inverso del N_e .

In condizioni di neutralità viene assunto che $u = k_a \geq k_s$, e ciò succede perché una mutazione che è avvenuta nel passato, potrebbe aver avuto tempo necessario per potersi fissare nella popolazione.

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 che il tasso di evoluzione del DNA mitocondriale supera quello della frazione a singola copia del genoma nucleare per un fattore 10, anche se non si può assumere che tutto il DNA mitocondriale evolva al 2% ogni milione di anni e con una velocità superiore 10 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, 7-3, 4 volte superiori al più veloce gene nucleare e 4, 5-9 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 e Pritchard, 1998).

Mutazioni sbagliate possono influenzare l'evoluzione del DNA mitocondriale, e c'è 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.

Orologio molecolare

$$T = \frac{K}{2r}$$

T → tempo di divergenza

K → numero di differenze nucleotidiche

2r → tasso di mutazione neutra

Considerando il tasso di mutazione del citocromo b che presenta un tasso di evoluzione costante.

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

	GENOMA NUCLEARE	GENOMA MITOCONDRIALE
Dimensioni	3300 mb	≈ 16 kb
N° differenti coppie di cromosomi omologhi	23	Una unico cromosoma circolare
N° totale di cromosomi per cellula	23 nelle cellule aploidi 46 in quelle diploidi	Alcune migliaia circa 8000 per cellula in alcuni tipi
Proteina associate	Alcune classi di proteine istoniche e non istoniche	Assenti
Numero di geni	≈ 65000-80000	37
Densità geni	≈ 1/40 kb	1/0, 45 kb
DNA ripetitivo	Lunghe frazioni	Molto piccole
Trascrizione	La maggioranza dei geni sono trascritti indivi- dualmente	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.

Tabella 1. Confronto tra genoma nucleare e mitocondriale

1.1.3 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 (1998) 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, 0-3, 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, in quanto 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).

GENE	Inizio (bp)	Terminazione (bp)	Dimensione (pb)
tRNA-Phe	1*	68	68
12SrRNA	69	1026	958
tRNA-Val	1027	1093	67
16SrRNA	1094	2667	1574
tRNA-Leu	2668	2742	75
NADH1	2745	3700	956
tRNA-Ile	3701	3769	69
tRNA-Gln	3767	3838	72
tRNA-Met	3841	3909	69
NADH2	3910	4951	1042
tRNA-Trp	4952	5018	67
tRNA-Ala	5020	5088	69
tRNA-Asn	5090	5162	73
Origine del L-strand replication	5163	5194	32
tRNA-Cys	5195	5262	68
tRNA-Tyr	5263	5330	68
COI	5332	6876	1545
tRNA-Ser (L)	6874	6944	71
tRNA-Asp	6950	7017	68
COII	7019	7702	684
tRNA-Lys	7706	7773	68
ATPasi8	7775	7975	201
ATPasi6	7936	8615	680
COIII	8616	9399	784
tRNA-Gly	9400	9468	69
NADH3	9469	9815	347
tRNA-Arg	9816	9884	69
NADH4L/NADH4	9885	11552	1675
tRNA-His	11553	11621	69
tRNA-Ser	11622	11681	60
tRNA-Leu	11683	11753	71
NADH5/ NADH6	11754	14085	2349
tRNA-Glu (L)	14086	14154	69
Cyt b	14159	15298	1140
tRNA-Thr	15302	15371	70
tRNA-Pro	15371	15436	66
Control Region	15437	16616	1180

Tabella 2. Caratteristiche del genoma mitocondriale ovino

(• per convenzione la posizione 1 bp si stabilisce tra la fine della regione di controllo e l'inizio del gene per il tRNA-Phe)

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 CBS3; ed è presente un lungo tratto di polipirimidine di 22 nucleotidi localizzato tra il CBS1 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 and Low 1987).

Nei cetacei, è una caratteristica comune un tratto di 15-18 polipirimidine e l'assenza del CBS-3 (Dillon e 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 altri vertebrati (Saccone *et al.*, 1991).

Inoltre sempre nella parte sinistra sono state ritrovate altre 4 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.

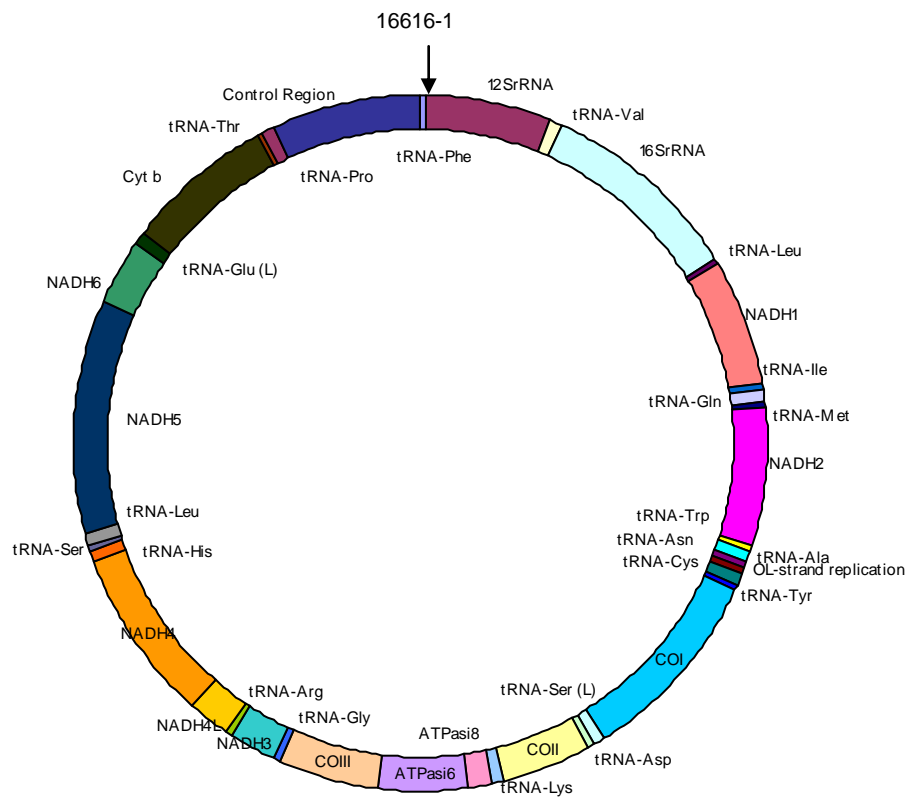


Figura 3. Shema del DNA mitocondriale ovino

1.2 DNA MITOCONDRIALE E FILOGENIA

1.2.1 Cenni storici

Numerosi studi archeozoologici datano l'inizio delle prime domesticazioni intorno agli 8-10000 anni fa, contemporaneamente nel sud-ovest asiatico, Asia dell' Est e nel continente Americano.

Tali eventi non accaddero per caso, in quanto la fine dell'ultima glaciazione (~18000 anni fa) portò ad un sensibile miglioramento del clima ed alla comparsa delle stagioni che favorirono la crescita di piante tuberose, con lunghe radici e che producevano semi, queste specie erano facili da raccogliere, coltivare e da immagazzinare, e quindi adatte all'attività agricola.

L'aumento della popolazione, diretta conseguenza dell'utilizzo di varietà di grano, riso e legumi, la stanzializzazione degli insediamenti e l'impossibilità di cacciare i grossi branchi di selvaggina a causa della crescita delle foreste portarono alla richiesta di nuove risorse alimentari.

Le tre aree principali di domesticazione del bestiame generalmente accettate sono: sud-ovest Asia (nella zona dalla mezzaluna fertile alla valle dell'Indo), est Asia (Cina e regioni al sud della Cina) e in sud America (Cordigliera delle Ande).

Bovini, ovini, caprini, suini e bufalini vennero addomesticati nelle due regioni dell'Asia, mentre lama ed alpaca in sud America; il cavallo invece fu addomesticato più recentemente (~6000 anni fa) a latitudini più elevate.

La transizione dalla caccia all'allevamento di animali selvatici è un'area di ricerca molto attiva, poiché rimane da stabilire sia le

circostanze e i tempi di queste transizioni, sia i cambiamenti nell'età e nella struttura sessuale delle popolazioni addomesticate.

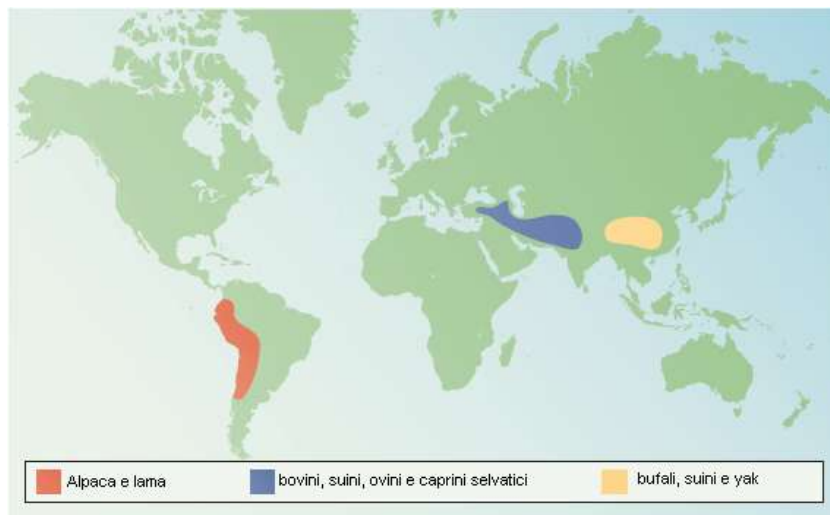


Figura 4. Principali centri di domesticazione

L'oggetto degli studi riguarda soprattutto capire quali popolazioni, sottospecie, o addirittura specie di progenitori selvatici furono addomesticati e quanto hanno contribuito al pool genico delle attuali razze allevate.

1.2.2 Filogenia e metodi di indagine

La Filogenesi o filogenetica o 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:

1. dovrebbe essere evolutivamente conservato per permettere l'identificazione del taxon selvatico o della popolazione da cui la specie discende;
2. 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;
3. 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 vengono tracciati 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 viene 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.

A causa dell'incompleta suddivisione dei geni, non c'è stata una ripartizione perfetta nelle specie, alcuni geni possono essere più presenti in un taxon piuttosto che in un altro.

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

Introggressione

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 introggressione da una specie all'altra.

L'introggressione 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 ed una dovuta all'incompleta suddivisione dei pedigree.

Ci sono molti esempi di 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 di introggressione nucleare o segnali morfologici.

L'introggressione mitocondriale avviene principalmente per due motivi:

1. 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 ad introggressione di quello nucleare.

2. deriva: 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.

1.2.3 Origine della pecora domestica

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

Molte specie o sottospecie 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 risulta estremamente 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 *et al.* (1998 e 2001) 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. (Tapio *et al.*, 2006 e Meawdows *et al.*, 2007).

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 a causa del 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 viene suddiviso 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 un pseudogene nucleare (*numt*), visto che fu osservato solo in un tipo di pecora caucasica.

Anche per l'aplogruppo E (Meadows *et al.*, 2007) si pensava fosse un *numt*, invece utilizzando anche in questo caso le sequenze di citocromo b, è stata verificata l'ipotesi di appartenenza ad 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 il problema dell'introgresione, 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.

1.3 LA RAZZA MERINOS

La razza Merinos è una razza ovina altamente specializzata per quanto riguarda la produzione della lana, sia per la quantità che la qualità del filamento lanoso; oltre a questo, la Merinos è un animale con buona attitudine carnea e una spiccata adattabilità ai diversi ambienti, caratteristica che ha permesso la sua diffusione in tutto il mondo e facendo sì che sia il ceppo ovino più numeroso del patrimonio mondiale.

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., attribuendo in definitiva la natività della razza Merinos alla penisola Iberica.

In realtà sulla vera origine non è stata fatta ancora chiarezza, infatti per alcuni 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, teoria che sarebbe avvalorata dal trattato sull'agricoltura dello scrittore arabo Zacarias Ahmed che visse in Andalusia precedentemente a questa data nel quale non si fa alcuna menzione al nome "Merino" o ad ovini da lana (Klein, 1920).

Tuttavia l'origine di questa razza potrebbe essere spagnola, in quanto sono stati ritrovati manufatti di epoca romana che dimostrano la presenza di una razza ovina con caratteristiche paragonabili a quelle della Merinos.

Durante l'epoca medievale la razza Merinos, fu monopolio del Regno Spagnolo sia per quanto riguarda l'allevamento sia per l'esportazione e vendita della lana.

Nel Rinascimento la consistenza della razza, nella penisola iberica, raggiunse i tre milioni di capi, che però subì una forte riduzione a causa dell'espansione agricola, della crisi dell'industria tessile e della perdita di interesse da parte dei regnanti per il sostegno al settore.

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 J., 1998).

1.3.1 La Merinos nel mondo

A seguito dei commerci di Merinos nel mondo, questa razza ebbe una rapida espansione, in base alla produzione e all'ambiente furono seguiti diversi criteri selettivi.

In alcune parti del mondo si parla di implantazione diretta del Merino Spagnolo, successivamente migliorato come ad esempio il Merino Precoce Francese ed il Rambouillet; in altri paesi i Merinos attuali derivano da incroci di diverse linee di Merinos autoctono con Merinos migliorati e nel terzo tipo di strategia selettiva, questa razza è stata introdotta come razza incrociante, soprattutto in quelle zone in cui le condizioni climatiche particolarmente difficili non permettevano l'adattamento della razza pura.

Attualmente questa razza annovera un totale di 131 linee Merinos: di queste, 63 corrispondono ad ecotipi o varietà e 68 a nuove razze che si sono formate con il suo contributo. Con i suoi 220 milioni di capi

rappresenta il 20 % della popolazione mondiale che sale al 30% se si prendono in considerazione le razze che hanno avuto origine da un suo contributo.

1.3.2 La Merinos in Italia

In Italia le prime introduzioni di capi di razza Merinos si ebbero nel 1435 e proseguirono fino al 1800. Nel 1960 erano presenti due razze di derivazione Merinos: la Sopravissana e la Gentile di Puglia, che contavano un censo di oltre 2 milioni di capi in totale, mentre oggi sono razze in pericolo di estinzione. In passato erano legate alla pratica della transumanza al pari della loro progenitrice spagnola (Analla *et al.*, 1998), che si svolgeva per la Sopravissana, dalle campagne romane all'Appennino Umbro-Marchigiano, mentre per la Gentile di Puglia, dal Tavoliere delle Puglie all'Appennino abruzzese (Tortorelli, 1984; Negrini, 1989)

La razza Sopravissana

La razza Sopravissana, deriva da un incrocio di sostituzione parziale tra arieti Merinos-Rambouillet, donati nel 1792 dal Re di Francia al cardinale Adani del papato di PIO VI.

Questi ovini furono mandati nei possedimenti papalini sull'Appennino marchigiano nelle zone di Visso e Castel S. Angelo e da qui l'area di allevamento si estese dalle Marche, all'Umbria, al Lazio, alla Toscana e all'Abruzzo, con un massimo numerico di circa un milione di capi.

A causa dell'ambiente particolarmente difficile si dovettero importare arieti Merinos a più riprese a ai fini di formare una popolazione merinizzata ben adattata alle condizioni di allevamento. Per far ciò si procedette all'incrocio la razza locale "Vissana" popolazione tenuta in

grande considerazione dai papi soprattutto per il rifornimento di carne alla città di Roma; tale ovino oggi estinto, rappresentava un ecotipo di quella che oggi è la razza Appenninica, che era importante per la fornitura di carne a Roma. Sul substrato genetico così creato si dovette procedere alla fissazione dei caratteri con nuove introduzioni di arieti Rambouillet, effettuate nel 1880 ad opera dei proprietari di greggi, Piscini e Rosi.

La selezione fu improntata verso la produzione di lana di qualità, oltre alla produzione del cosiddetto “’abbacchio romano” cioè un agnello macellato a 30- 40 gg e del formaggio romanesco derivato dal latte; portando a definire la Sopravissana, una razza a triplice attitudine.

La razza Gentile di Puglia

La storia della Gentile di Puglia inizia nel 1435 con l’importazione in Italia meridionale, di arieti Merinos per volere di Alfonso I d’Aragona. L’importazione si effettuò nell’allora Daunia o Capitanata effettuando un incrocio di sostituzione su razze autoctone pugliesi soprattutto la Garfagna (Dell’Aquila *et al.*, 1995).

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 un censo di oltre un milione di capi, anche in conseguenza del fatto che vennero assimilate ad essa molte popolazioni merinizzate della zona dell’Irpinia e del Sannio, e Calabria con caratteristiche disomogenee come la Gentile di Calabria, la Gentile Lucana, la Quadrella o Bastarda spagnola, pecora del Castello di Alife, la Petraiola, la San Giorgio, la Marcone e la Molara (Sarti, 1996).

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

2 SCOPO DELLA TESI

Scopo della Tesi è lo studio della variabilità genetica e delle relazioni filogenetiche della razza Sopravissana e Gentile di Puglia a livello della regione ipervariabile del DNA mitocondriale, attraverso l'uso della tecnica PCR-sequencing.

In particolare si è voluto studiare attraverso il confronto con altre razze, in particolare quelle appartenenti al ceppo Merinos, la filogenia delle razze derivate merinos italiane e valutare la sensibilità dell'analisi nel discriminare tra razze molto vicine geneticamente.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Il campionamento

L'indagine è stata effettuata su un campione di individui di entrambi i sessi appartenenti alla razza Sopravissana (20) e Gentile di Puglia (10) iscritti al Libro Genealogico.

Per ciascuna razza è stata effettuata la raccolta di materiale biologico individuale (sangue) in differenti allevamenti al fine di aver un campione il più possibile rappresentativo.

Più precisamente sono stati scelti pecore ed arieti, che presentavano una morfologia rispondente allo standard; poiché tale campione rispecchiava la struttura riproduttiva della popolazione, si presentava sbilanciato a favore del sesso femminile.

Come già detto il materiale biologico utilizzato come fonte di DNA è stato il sangue e, più precisamente, la sua componente leucocitaria, dal momento che gli eritrociti, nella specie ovina, si presentano anucleati.

Il sangue è stato prelevato, mediante provette vacutainer contenenti EDTA (acido Etilendiamminotetracetico) come anticoagulante dalla vena giugulare, a livello della regione del collo.

Il sangue prelevato è stato trasportato in contenitori refrigerati e conservato in cella frigorifera a 4° C fino al momento dell'estrazione.

Gli allevamenti in cui sono stati prelevati i campioni erano distribuiti tra le province di Rieti e Roma per la Sopravissana e nelle province di Foggia e Campobasso per la Gentile di Puglia.

Oltre a quelle delle razze in studio, le sequenze del D-loop di altre razze di varia provenienza sono state ottenute dalle banche dati

online (NBCI) al fine di comparare i dati ottenuti scegliendole tra tutti i 5 aplogruppi osservati da altri autori (Tabella 3).

APLOGRUPPO	ACCESSION NUMBER	RAZZA	AUTORE	ANNO	PROVENIENZA GEOGRAFICA
A	AF010407	Merinolandschaf	Hiendleder	1998	Germania
A	AF039578	Merinolandschaf	Hiendleder	1998	Germania
A	DQ097453	Morkaraman	Pedrosa	2005	Turchia orientale
A	DQ097455	Karayaka	Pedrosa	2005	Turchia settentrionale
A	DQ097456	Morkaraman	Pedrosa	2005	Turchia orientale
B	AF039577	Merinolandschaf	Hiendleder	1998	Germania
B	DQ097432	Karayaka	Pedrosa	2005	Turchia settentrionale
B	DQ097434	Hemsin	Pedrosa	2005	Turchia nord-orientale
B	DQ097435	Tuj	Pedrosa	2005	Turchia nord-orientale
B	DQ097442	Karayaka	Pedrosa	2005	Turchia settentrionale
B	AF039579	Muflone	Hiendleder	1998	Germania
B	DQ791128	Merino	Pedrosa	2005	Spagna
B	DQ791065	Merino	Pedrosa	2005	Spagna
B	DQ791063	Merino	Pedrosa	2005	Spagna
B	DQ791059	Merino	Pedrosa	2005	Spagna
B	DQ791054	Merino	Pedrosa	2005	Spagna
C	DQ097463	Karayaka	Pedrosa	2005	Turchia settentrionale
C	DQ097464	Morkaraman	Pedrosa	2005	Turchia orientale
C	DQ097465	Akkaraman	Pedrosa	2005	Turchia centrale
C	DQ097466	Hemsin	Pedrosa	2005	Turchia nord-orientale
C	DQ097467	Karayaka	Pedrosa	2005	Turchia settentrionale
D	DQ852288	Karakas	Meadows	2007	Turchia
D	DQ852289	Karakas	Meadows	2007	Turchia
E	DQ852280	Awassi	Meadows	2007	Israele
E	DQ852281	Awassi	Meadows	2007	Israele
SELVATICI	AF242347	Argali	Hiendleder	2002	Mongolia
SELVATICI	AY091489	Urial	Hiendleder	1998	Kazakistan

Tabella 3. Sequenze ottenute dalle banche dati on line.

Dai campioni inizialmente presi in esame, si è proceduto alla selezione delle sequenze di maggior qualità portando alla riduzione da 20 a 13 per la Sopravvissana e da 10 a 7 per la Gentile di Puglia. Il campione finale è quindi composto da 47 sequenze, le 20 italiane unite a quelle della tabella 3.

3.2 Estrazione del DNA totale

Il DNA totale (DNA genomico + DNA mitocondriale) è stato estratto partendo da 200 µl di sangue precedentemente congelato per favorire la lisi della componente cellulare, utilizzando un Kit commerciale (GenElute™ Blood Genomic DNA Kit Sigma-Aldrich).

Il kit prevede l'utilizzazione di una resina di purificazione inserita in colonne centrifugabili.

3.3 Disegno dei primer

Al fine di ottenere la sequenza desiderata nella reazione di PCR si è dovuto procedere con il disegno dei primer, una sequenza oligonucleotidica che funziona da innesco per l'enzima DNA polimerasi.

La regione di controllo del DNA mitocondriale è circondata dai geni che codificano per l'RNA di trasferimento degli amminoacidi Prolina e Fenilalanina; questa regione è lunga circa 1200 nucleotidi.

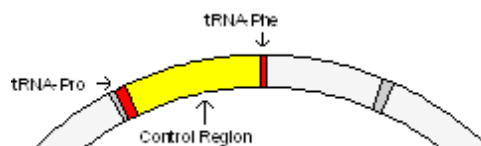


Figura 5. Particolare del DNA mitocondriale ovino

Per procedere al disegno di un'appropriata coppia di primer per amplificare la regione di controllo del DNA mitocondriale, si è dovuto tener conto di 3 aspetti fondamentali:

- la sequenza da amplificare doveva essere abbastanza ampia in modo da garantire una certa specificità e garantire l'assenza di amplificazioni di copie nucleari del D-loop;
- il sito di appaiamento dei primer doveva essere conservato all'interno della specie in studio e dovevano essere assenti punti di mutazione avrebbero impedito la formazione di un legame forte tra primer e DNA stampo;
- che la coppia di primer avrebbe dovuto presentare un'elevata affinità per il sito di appaiamento in modo da scongiurare la possibilità di amplificazioni aspecifiche.

Si è quindi deciso di scegliere, come sito di appaiamento dei primer due zone adiacenti alla regione di controllo (Figura 5 e 6) che sono rispettivamente il gene che codifica per l'RNA di trasferimento dell'amminoacido Prolina e quello per l'amminoacido Fenilalanina che delimitano una sequenza di circa 1200 bp che va in direzione 5'→3' dalla posizione 15371 bp (inizio tRNA-PRO) alla 68 bp (fine tRNA-PHE).

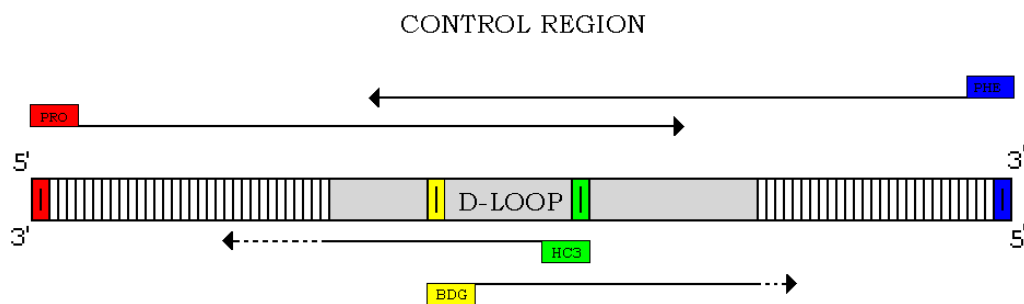


Figura 6. Posizione dei primer

Allo scopo di individuare un sito conservato in ambo le regioni si è proceduto ad allineare, tramite il programma ClustalW (Higgins *et al.*, 1994), le sequenze dei geni tRNA-PRO e tRNA-Phe di differenti soggetti appartenenti alla famiglia dei bovidi (Figura 7) reperite in Genbank i cui *accession number* sono riportati nella tabella 4

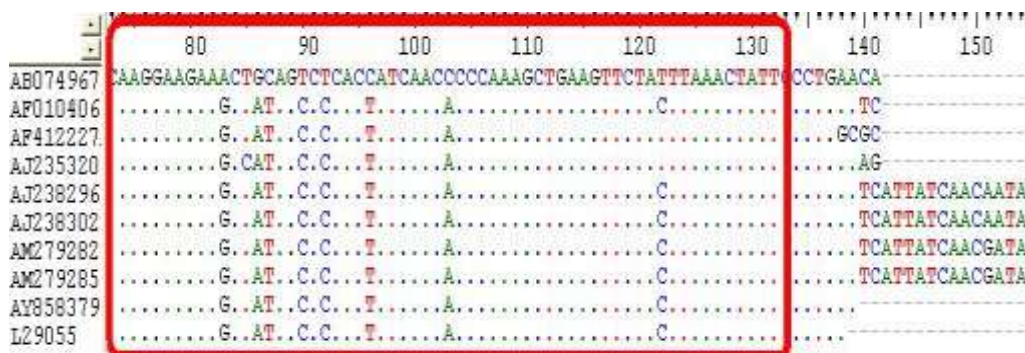


Figura7: Parte delle sequenze del gene tRNA-Pro allineate in diversi soggetti della famiglia dei Bovidi

TASSONOMIA	NOME	ACCESSION NUMBERS	AUTORE
<i>Ovis aries</i>	Pecora	AY858379	Ha
<i>Ovis aries</i>	Pecora	AF010406	Hiendleder
<i>Ovis aries</i>	Pecora	AM279285	Fajardo
<i>Ovis aries</i>	Pecora	AM279282	Fajardo
<i>Ovis aries</i>	Pecora	L29055	Zardoya
<i>Ovis ammon</i>	Argali	AJ238302	Wu
<i>Ovis ammon</i>	Argali	AJ238296	Wu
<i>Alces alces</i>	Alce europeo	AF412227	Hundertmark
<i>Gazella gazella</i>	Gazzella di montagna	AJ235320	Douzery
<i>Bos Taurus</i>	Bovino	AB074967	Mannen

Tabella 4. Sequenze ottenute dalla banche dati on line di differenti soggetti appartenenti alla famiglia dei bovidi.

Individuati due siti (*forward* e *reverse*) conservati in tutte le specie prese in esame, si è proceduto al disegno dei primer tramite il

software Primer3 0.4.0 (Rozen *et al.*, 2000) indicando i seguenti parametri:

1. temperatura di appaiamento del singolo primer: min. 57°/opt. 60°/max. 63°C;
2. lunghezza massima del singolo primer: min. 18 bp/max. 27 bp;
3. lunghezza massima dell'amplificato: max. 1300 bp.

Oltre alla precedente è stata disegnata un'ulteriore coppia di primer detti "nested", (BDG, *forward* e HC3, *reverse*), ovvero interni alla sequenza amplificata da utilizzare nella successiva reazione di sequenziamento (Pedrosa *et al.*, 2005); tale accortezza è stata dettata dalla necessità di 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).

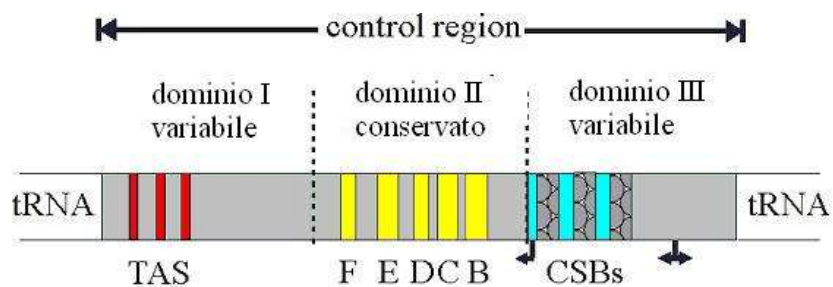


Figura 8: Schema rappresentante i domini presenti nella regione di controllo.

Anche i due primer interni o "nested", sono stati disegnati attraverso il software Primer3 sul dominio conservato del D-loop "D" (CSB-D, conserved sequences block D).

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 5: I primer utilizzati per la PCR e per il sequenziamento

3.4 Amplificazione della Regione di Controllo

Una volta ottenuto il DNA di ogni campione, si è passati all'amplificazione della sequenza di interesse mediante l'uso della PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Per aumentare la specificità della reazione di PCR, si è proceduto all'ottimizzazione della stessa, variando, in un set di 10 campioni, la temperatura di ibridazione (Tm) e la concentrazione dello ione [Mg⁺⁺] libero, osservando il miglior compromesso tra assenza di amplificati secondari e resa del prodotto principale a 57°C e con una concentrazione finale del MgCl₂ pari 2mM.

Ogni reazione presentava un volume finale di 25 µl , costituito da 1µl di DNA diluito 1 / 10 (~50ng) e 24 µl di miscela di PCR, così composta:

COMPONENTE	µl
PCR buffer 10X (<i>Biotools</i> o <i>Applied Biosystems</i>)	2, 5
DNTPs 100 mM	0, 2
Primer Forward 5 µM	1
Primer Reverse 5 µM	1
MgCl ₂ 50 mM	1
<i>Biotools</i> DNA polymerase 5U/ µl	0, 2
H ₂ O Ultra Pura	25

Tabella 6. Caratteristiche della miscela di PCR

Le reazioni di PCR sono state effettuate in un termociclatore automatico GeneAmp® PCR System 9700, della *Applied Biosystem*.

Il ciclo di PCR usato è composto di una fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti e successivi 32 cicli dei seguenti tre passaggi: 30 sec a 95°C; 40 sec a 57°C e 1 min a 72°C; il tutto seguito da un'estensione finale di 3 minuti a 72°C.

Un'aliquota del prodotto di PCR è stata sottoposta a corsa elettroforetica (80 V) su gel di agarosio all' 1, 2% (contenente Bromuro di Etidio) in tampone TBE (Tris-Boro, EDTA) 0, 5X e visualizzata mediante esposizione ad un transilluminatore a raggi ultravioletti utilizzando un marker di peso molecolare al fine di valutare la riuscita della reazione e l'assenza di amplificati secondari.

3.5 Sequenziamento dei prodotti

3.5.1 Purificazione della reazione di PCR

La purificazione dell'amplificato è necessaria per la rimozione dei dNTPs e dei primer in eccesso che causerebbero degli errori nella reazione di sequenziamento.

La reazione di PCR è stata purificata con il kit commerciale *Magnasil Yellow*® di (Promega). questo consiste in una soluzione contenente particelle metalliche che hanno affinità di legame per gli acidi nucleici che vengono purificati grazie all'impiego di una placca magnetica in dotazione.

Il protocollo operativo consiste nel portare i campioni al volume di 100 µl, aggiungendo acqua ultra pura autoclavata e ponendoli in un "collection plate". Dopo averlo risospeso per inversione, vengono aggiunti 100µl di il *Magnasil Yellow* a ciascun campione ed il tutto

mescolato per mezzo di un pipettatore automatico lasciato incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.

Nel secondo passaggio il plate è collocato sopra una placca magnetica che permette di separare il dimero particella-DNA ed eliminare il soprannatante. Si risospende con 200 µl di *Wash Solution*, dopo la rimozione dei campioni dalla placca magnetica e nuovamente incubato a temperatura ambiente per 5 minuti.

Si ricolloca sulla placca magnetica, e si elimina il soprannatante. Il campione viene infine lavato 2 volte con 200 µl di etanolo all'80%. Una volta lavato ed asciugato a temperatura ambiente per 15 minuti, il pellet viene risospeso in 100 µl di acqua ultrapura autoclavata; in questa fase la particella viene separata dal DNA che può essere recuperato in soluzione acquosa. Il prodotto di PCR così purificato può essere conservato a -20° C, per lunghi periodi, o a 4° C per un pronto uso.

3.5.2 Reazione di sequenziamento

La reazione di sequenziamento consiste in una reazione di PCR in presenza di Di-deossi nucleotidi che permettono, tramite fluorocromi, di determinare l'esatta sequenza del frammento in esame quando sottoposto ad elettroforesi. La reazione necessita di un'esatta quantità di DNA a seconda della fonte:

DNA	ng totali
PCR 100/200 bp	1-3
PCR 200/500 bp	3-10
PCR 500/1000 bp	5-20
PCR 1000/2000 bp	10-40
PCR >2000 bp	40-100
Cosmide	1000
Genoma batterico	2000-3000

Tabella 7: quantità di DNA stampo necessaria in base alla dimensione del prodotto di PCR

Per il sequenziamento è stato utilizzato un kit commerciale, BigDye™ versione 3.1 (Applied Biosystem) e le quantità di reagenti sono quelle riportate nella tabella seguente:

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
H ₂ O ultra pura	a 12

Tabella 8: 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 interni. 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)

3.5.3 Elettroforesi dei prodotti di sequenziamento.

Prima di procedere alla corsa della reazione di sequenziamento, si deve procedere alla purificazione dei prodotti tramite un Kit commerciale *Magnasil Green*® (Promega) che utilizza, parimenti al kit utilizzato in precedenza, particelle metalliche che hanno affinità per le molecole di DNA e permette di purificare la reazione dai Di-deossi nucleotidi non incorporati, grazie all'uso di una placca magnetica.

In questo caso la lisi dei dimeri formati tra frammento di DNA e la particella magnetica avviene tramite l'aggiunta di 6 μ l di loading buffer (formammide deionizzata e blu destrano in ragione di 5:1); il campione così ottenuto è pronto per l'elettroforesi, previa

denaturazione a 95° per 5 minuti e raffreddamento in ghiaccio per 2 minuti.

L'elettroforesi è stata condotta in un sequenziatore automatico ABI PRISM 377 utilizzando cristalli di 36 cm , con distanziatori da 0, 2 mm, un gel di poliacrilammide con una concentrazione del 7% (ReproGel™) a 48 pozzetti.

L'elettroforesi è stata condotta in buffer TBE 1X e utilizzando 1200 scansioni laser per minuto, per una durata complessiva della corsa di 7 ore con un voltaggio di 1260 V.

3.6 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.*, 2007) 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 (Higgins *et al.*, 1994) presente nel programma Mega (Figura 9).

Una prima analisi filogenetica sui risultati è stata condotta sempre utilizzando il software Mega 4.0 (Kumar *et al.*, 2007), attraverso il metodo Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) ed utilizzando alternativamente i modelli di *p-distance* (Nei *et al.*, 2000) e di Tamura-Nei (Tamura-Nei, 2000). Da queste analisi sono stati poi costruiti degli alberi filogenetici mediante *Bootstrapping* dei dati (1000 replicazioni) (Nei *et al.*, 2000).

Tramite il software DNAsp 4.10.9 (Rozas *et al.*, 2003) sono stati raggruppati gli aplotipi simili all'interno del campione, al fine di creare un datafile utilizzabile per il successivo calcolo di un albero filogenetico con il metodo Median-Joining Networks (Bandelt *et al.*, 1999).

Il software DNAsp è stato utilizzato anche per il calcolo del numero di aplotipi, della diversità aplotipica, del numero di posizioni polimorfiche, del numero medio di differenze nucleotidiche e della diversità nucleotidica.

Infine con il software Arlequin 3.1 (Excoffier, 2006) è stata calcolata l'AMOVA (Analysis of MOlecular VARiance) suddividendo il campione in diversi gruppi geografici e razziali.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Dall'analisi delle sequenze del campione totale (47 sequenze di D-loop) è emerso che il numero totale di differenti aplotipi è 27 con un totale di 104 siti polimorfici.

Per quanto riguarda invece le razze appartenenti al ceppo Merinos, su un totale di 28 individui (13 Sopravissane, 7 Gentili di Puglia, 5 Merinos Spagnole e 3 Merinolandschaf) si è osservato un numero totale di 21 aplotipi, con un totale di 70 siti polimorfici.

Inoltre è stato riscontrato un numero di 7 aplotipi per la razza Sopravissana, 7 per la Gentile di Puglia, 4 per la Merinos Spagnola e 3 per la Merinolandschaf, mentre il numero di siti polimorfici è stato rispettivamente di 27, 32, 19 e 18. (Tabelle 9 e 10).

Si è quindi studiata la diversità nucleotidica, rappresentata dalla probabilità che due sequenze prese a caso differiscano in una determinata posizione. Questa è risultata nel totale del campione di

0,027, leggermente maggiore di quella riscontrata da Pedrosa *et al* (2007) che risultava pari a 0,009 in un'analisi compiuta su 25 razze della Penisola Iberica.

Tra le razze prese in esame le due italiane hanno mostrato valori comparabili con quelli riportati da altri autori (Pedrosa *et al*, 2005 e Pardeshi *et al*, 2007) come è riportato in tabella 10, con valori leggermente superiori per la razza Gentile di Puglia, probabilmente dovuti alla minore pressione selettiva a cui questa razza è stata sottoposta.

Passando poi all'analisi della diversità aptotipica, (probabilità che due sequenze prese a caso siano differenti), si è ottenuto un valore di 0,89 nell'intero campione.

Tale valore è del tutto sovrapponibile ai risultati conseguiti da altri autori, mentre per quanto riguarda le razze italiane si è osservato un valore di 1,0, e per la Merinolanshaf di 0,66; ciò potrebbe essere legato alla scarsa numerosità del campione.

Altro parametro preso in esame è il numero medio di differenze nucleotidiche, che per il campione totale è di 17,14, mentre nrlo specifico è stato di 11,09 per la Gentile di Puglia e 5,2 per la Sopravissana. Tale valore è stato rispettivamente di 12,0 e 8,8 per la Merinolandschaf e per la Merinos Spagnola.

Si può quindi osservare, da una prima analisi dei dati, che in generale in tutte le razze analizzate è presente un'alta variabilità genetica a livello di DNA mitocondriale con particolare riferimento alle razze del ceppo Merino, come per altro osservato da Pedrosa *et al* (2007).

Analizzando i risultati ottenuti dalle razze italiane, si può concludere che la razza Gentile di Puglia manifesta una più alta diversità genetica rispetto alla Sopravissana (Tabella 10), legato molto

probabilmente alla maggiore ampiezza dell'areale di allevamento della prima.

Infine il parametro della diversità aplotipica ci fa concludere che il campione delle sequenze studiate è risultato rappresentativo nelle due razze italiane essendo del tutto simile a quello riscontrato nell'analisi delle sequenze reperite in GeneBank (valore medio: 0,92) e a quello riportato da altri autori come Pardeshi *et al.* (2007).

L'inferenza filogenetica ha permesso di individuare le relazioni delle due razze italiane con il campione dei diversi aplogruppi individuati nella specie ovina da altri autori.

In particolare dallo studio degli alberi filogenetici (figure 10, 11 e 14) si evince che sia la Sopravissana, che la Gentile di Puglia si posizionano nell'aplogruppo B (Figura 14), costituito secondo Hiendlder (2002), Tapio (2006), Meadows (2007) e Pedrosa (2005) da razze europee, tuttavia si nota che la Gentile di Puglia si situa in un ramo più divergente dell'Aplogruppo B.

Difatti, confrontando le distanze genetiche (Tabella 11) della Gentile di Puglia, si vede che questa ha valori più elevati nel confronto con le altre razze rispetto alla Sopravissana.

È interessante notare, inoltre, che alcuni aplotipi appartenenti alla razza Merinos Spagnola si localizzano nello stesso cluster della Gentile di Puglia; questo farebbe supporre che l'importazione di soggetti di razza Merinos dalla Spagna avvenuta nel 1435, non fosse limitata ai soli arieti, come si è ipotizzato per anni, ma in realtà ad interi nuclei (arieti e pecore). Invece, la notevole divergenza tra le due razze italiane potrebbe essere dovuta alla grande differenza tra le razze originarie (Vissana e Garfagna) sostituite per incrocio dal Merinos.

Per quanto riguarda la disposizione dei restanti aplogruppi, essa è pressochè sovrapponibile a quella ottenuta da altri autori che posizionano la maggior parte delle razze euroasiatiche negli aplogruppi A e B (Hiendleder, 2002 e Pedrosa, 2005), mentre le razze prettamente asiatiche sono ripartite tra gli aplogruppi C, D ed E (Tapio, 2006 e Meadows, 2007); le specie selvatiche Argali e Urial si distanziano nettamente da questi ultimi (Hiendleder, 1998) come si può anche osservare dalle elevate distanze genetiche dalle quali si ottiene il valore medio di 0,053 (Tabella 11). Il muflone europeo, come già affermato da Hiendleder nel 2002, si inserisce all'interno dell'aplogruppo B.

I valori di bootstrap visibili in figura 12 e 13, che sono indice della robustezza dei nodi (vale a dire la probabilità che un determinato ramo abbia quella posizione) si attestano su 98 e 96 per quanto riguarda l'aplogruppo B. All'interno di questo, tutte le Gentili di Puglia si posizionano in una ramificazione il cui nodo ha un valore di Bootstrap di 69.

L'alto valore di bootstrap all'altezza del nodo della ramificazione dell'aplogruppo "selvatico" (85 e 86) è indice della validità dei campioni utilizzati come outgroup (Urial e Argali).

Infine la ripetibilità degli alberi filogenetici calcolati con i due algoritmi statistici *p-distance* e Tamura-Nei confermano la correttezza dell'analisi statistica.

Gli alberi filogenetici ottenuti tramite l'algoritmo Median Joining Network (Figure 15 e 16) sono una rappresentazione grafica delle distanze genetiche sottoforma di reti, che permettono di visualizzare contemporaneamente tutte le possibili ramificazioni, e sono particolarmente indicati per piccole distanze genetiche, ampi dataset e assenza di ricombinazione.

I risultati presenti in figura 15 riconfermano la disposizione generale degli aplogruppi precedentemente descritta, seppur con piccole variazioni tra gli aplogruppi asiatici.

Per quanto riguarda le razze italiane si riconferma la loro appartenenza all'aplogruppo B e la netta separazione della Gentile di Puglia dalla Sopravissana per le ragioni precedentemente descritte.

La Merino Spagnola, che appare ben distinta dalla Sopravissana, presenta forti relazioni filogenetiche con la Gentile di Puglia, che potrebbero essere dovute all'interscambio di animali avvenuto in epoca romana tra il Sud Italia e la Spagna, come viene citato dagli scritti dell'epoca (Columella) e per l'importazione di soggetti di sesso femminile nel XV secolo, come prima accennato.

Nella figura 16 è riportato lo stesso Median Joining Network disponendo i diversi cluster secondo l'origine geografica.

Infine si è passati ad analizzare l'AMOVA (*Analysis of MOlecular VAriance*) come si può osservare in tabella 12.

Il campione è stato dapprima raggruppato per continente (Europa contro Asia), poi per provenienza (Italia contro Asia ed Europa; Italia contro Germania; Italia contro Spagna; Italia contro Asia) ed infine paragonando il ceppo Merino con il resto del campione.

I risultati ottenuti hanno evidenziato innanzitutto che la varianza totale del campione tra Europa ed Asia è stata del 20,59 %, valore del tutto simile a quello osservato da Chen *et al.*, 2006 (19, 61%).

La varianza totale è stata del 10,29% quando si confrontano le due razze italiane con il resto del campione e del 20,17% quando queste vengono paragonate alle razze asiatiche, ciò potrebbe essere spiegabile dal fatto che la prima analisi tiene conto anche delle razze europee, mentre la seconda, tenendo conto solo delle razze asiatiche, rivela un'elevata correlazione tra distanza genetica e distanza

geografica; si deve considerare inoltre che le due derivate Merinos italiane sono state sottoposte in passato ad un'intensa azione di miglioramento con altri tipi genetici europei.

Il valore è risultato negativo (-4,27%) quando si confrontano le razze italiane e le tedesche. Un valore negativo indica un'assenza di variazione ed una correlazione tra le frequenze genetiche; in questo caso il risultato potrebbe essere dovuto alla massiccia importazione dalla Germania verso l'Italia di animali di derivazione Merinos per migliorare la produzione di carne (Pollidori *et al.*, 1989), anche se il dato non è risultato significativo, probabilmente a causa del piccolo numero di soggetti tedeschi.

Un altro valore negativo (-27,64%) è stato ottenuto nel confronto tra Italia e Spagna, confermando il risultato che si osserva negli alberi filogenetici, dove la Merinos Spagnola e la Gentile di Puglia appaiono mescolate; anche in questo caso la non significatività del dato può essere ricondotto all'esiguo numero di animali spagnoli.

5 CONCLUSIONI

In definitiva, le razze italiane di derivazione Merinos Sopravissana e Gentile di Puglia hanno mostrato un'alta variabilità genetica ed una struttura di popolazione ben definita.

Tornando alla finalità dello studio, ne è emerso che all'interno delle due razze italiane la Gentile di Puglia mantiene rapporti filogenetici più stretti con la Merinos Spagnola.

Lo studio del DNA mitocondriale si è rivelato un potente mezzo di indagine conoscitiva delle popolazioni di interesse zootecnico ai fini della comprensione dell'origine, diversità genetica e struttura delle popolazioni prese in esame.

Tuttavia, come già riportato da altri autori (Hiendleder, 1998) rimane difficile individuare l'esatta dinamica dell'evoluzione delle popolazioni ovine e rimane perciò essenziale integrare i risultati ottenuti con quelli provenienti da altre indagini di tipo molecolare (studio del Cromosoma Y e Microsatelliti).

In generale, pertanto è possibile affermare che le razze appartenenti al ceppo Merinos possono essere ben differenziate tra di esse, anche attraverso l'analisi del DNA mitocondriale.

Figura 9. Schermata di allineamento del software MEGA



Tabella 9: numero dei campioni delle razze utilizzate (N), numero di aplotipi osservati e aplogruppi di appartenenza.

RAZZA	N	APLOTIPI	APLOGRUPPI
AKKARAMAN	1	1	C
ARGALI	1	1	SELV
AWASSI	2	1	E
GENTILE DI PUGLIA	7	7	“B”
HEMSIN	2	2	B, C
KARAKAS	2	1	D
KARAYAKA	5	3	A, B, C
MERINOS SPAGNOLO	5	4	B
MERINOLANSCHAF	3	3	B
MORKARAMAN	3	2	A, C
MUFLONE	1	1	B
SOPRAVISSANA	13	7	“B”
TUJ	1	1	B
URIAL	1	1	SELV

Tabella 10: parametri della misura della diversità genetica

Razza	N	Diversità Nucleotidica	Diversità Aplotipica	N° Di Differenze Nucleotidiche	Siti Polimorfici
SOPRAVISSANA	13	0,00801 ± 0,00117	1,000 ± 0,030	5,29487	27
GENTILE DI PUGLIA	7	0,01686 ± 0,00314	1,000 ± 0,076	11,09524	32
MERINOLANDSCHAF	3	0,01815 ± 0,00856	0,667 ± 0,314	12,00000	18
MERINO SPAGNOLO	5	0,01335 ± 0,00231	1,000 ± 0,126	8,80000	19
ITALIANE	20	0,01610 ± 0,00188	1,000 ± 0,016	10,51053	56
TRONCO MERINO	28	0,01757 ± 0,00195	0,997 ± 0,010	11,38360	70
TOTALE	47	0,02659 ± 0,00228	0,997 ± 0,005	17,14986	104

Figura 10: Neighbor Joining con metodo Tamura-Nei

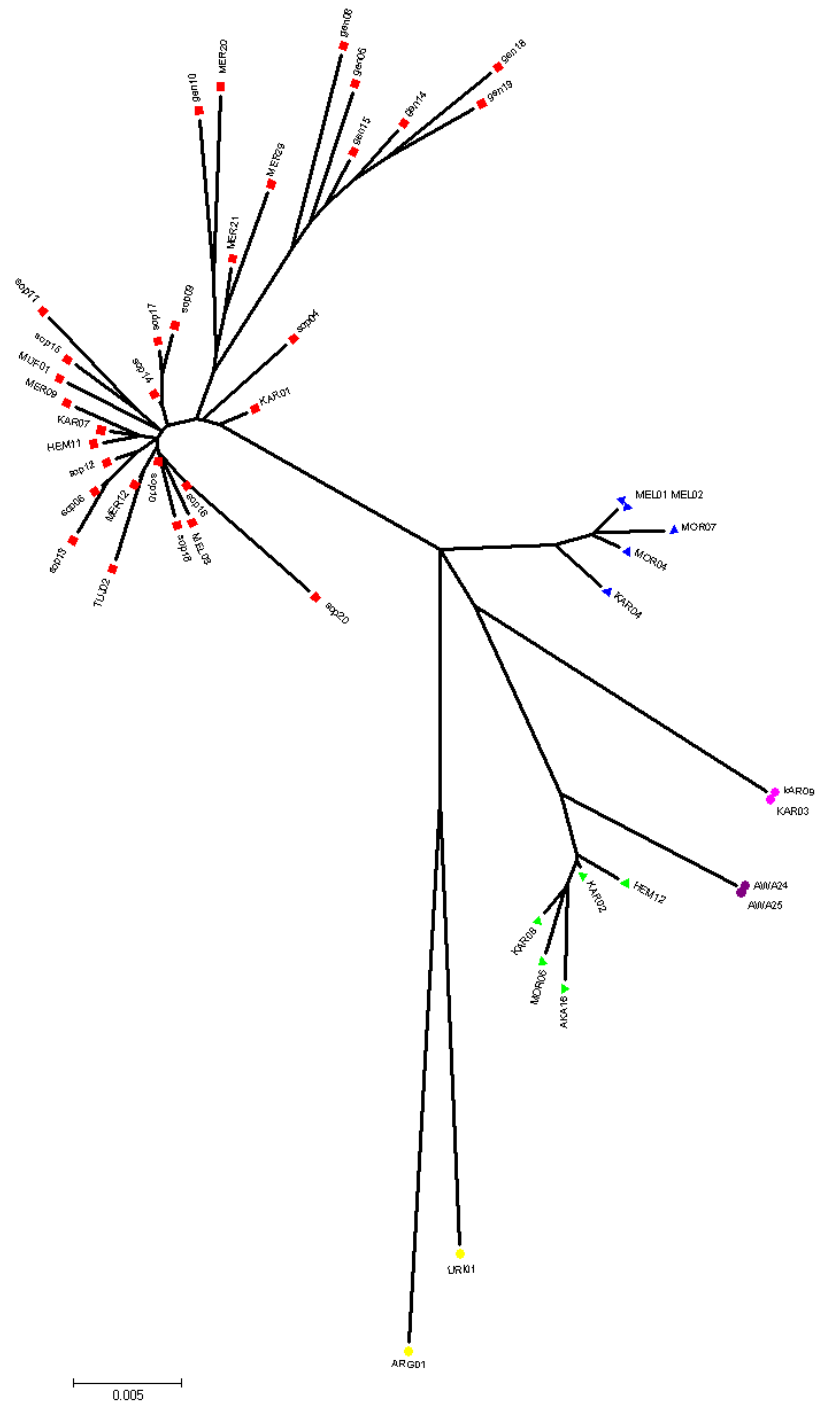


Figura 11: Neighbor Joining con metodo P-Distance

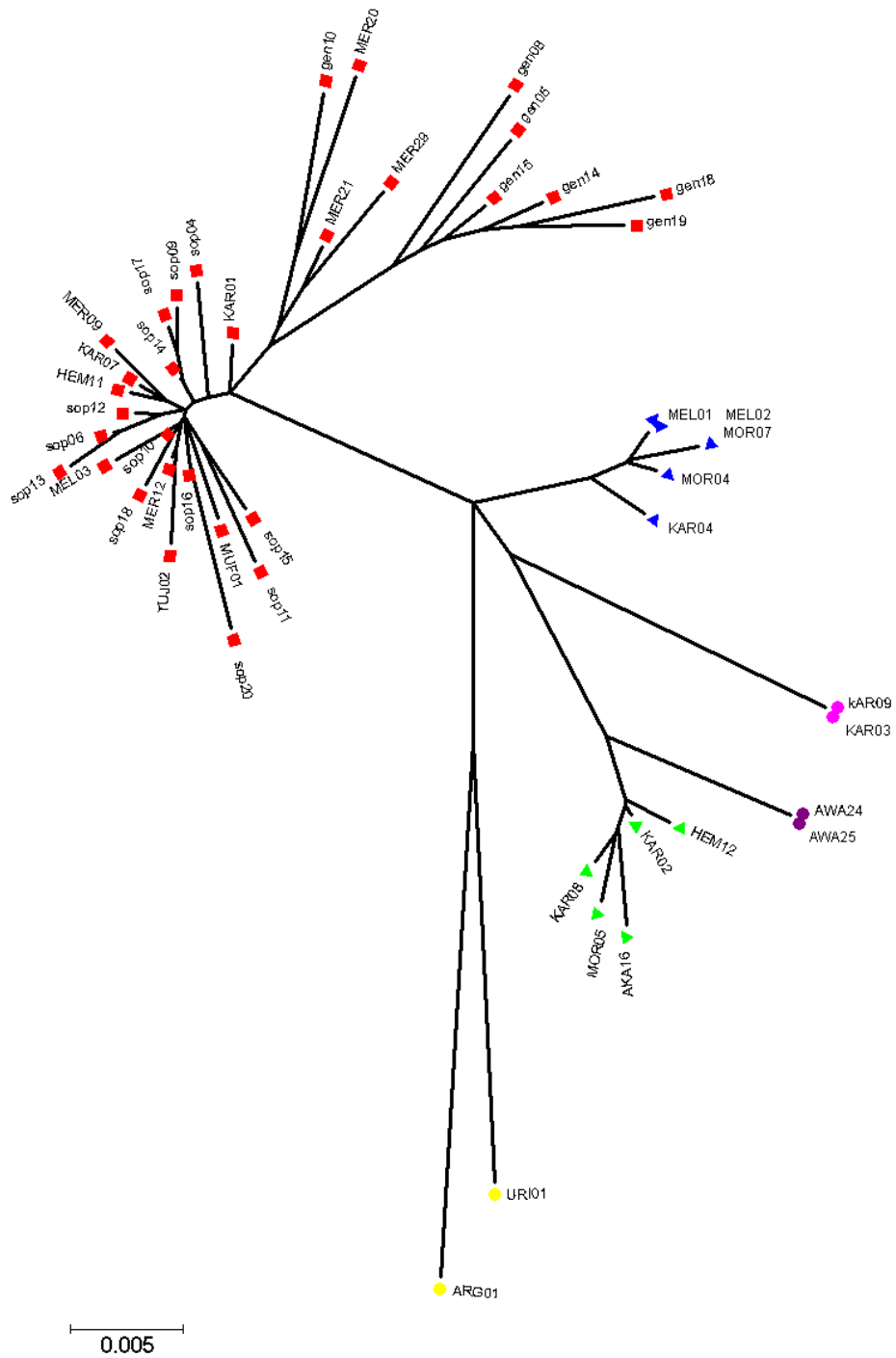


Figura12: Neighbor Joining con metodo Tamura-Nei con 1000 bootstrapping.

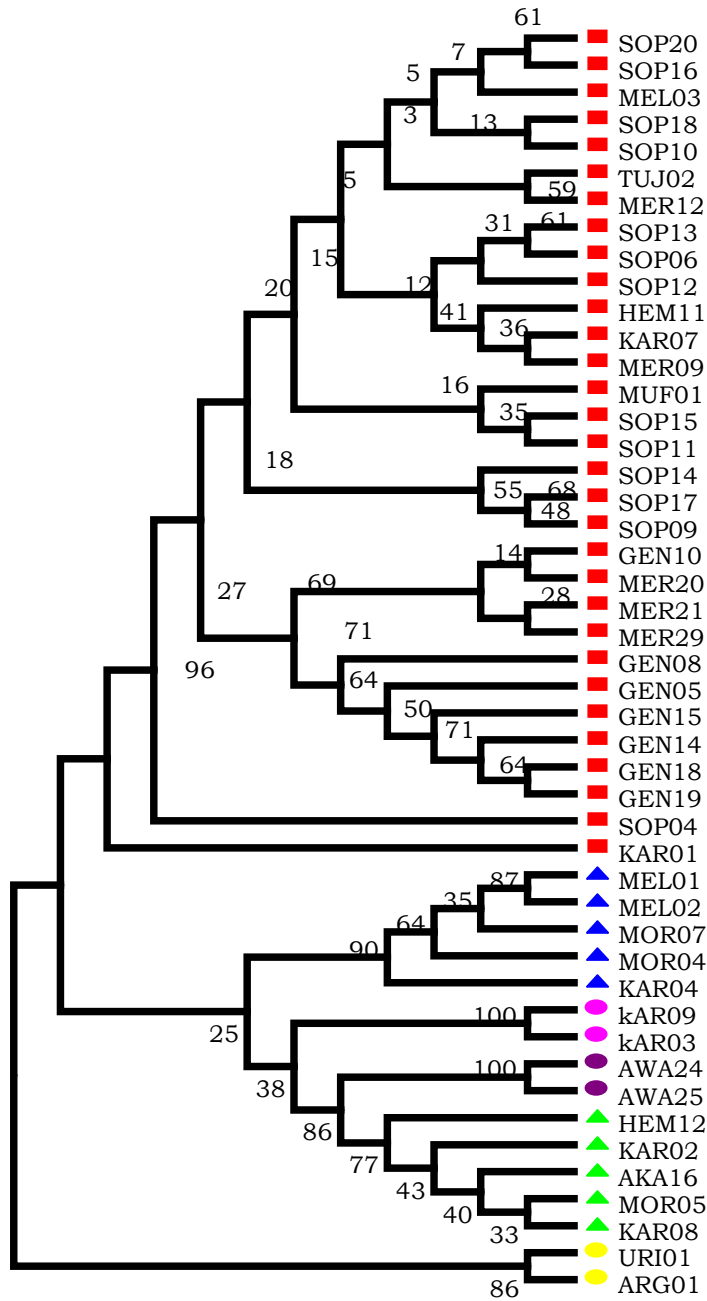


Figura 13: Neighbor Joining con metodo P-Distance con 1000 bootstrapping

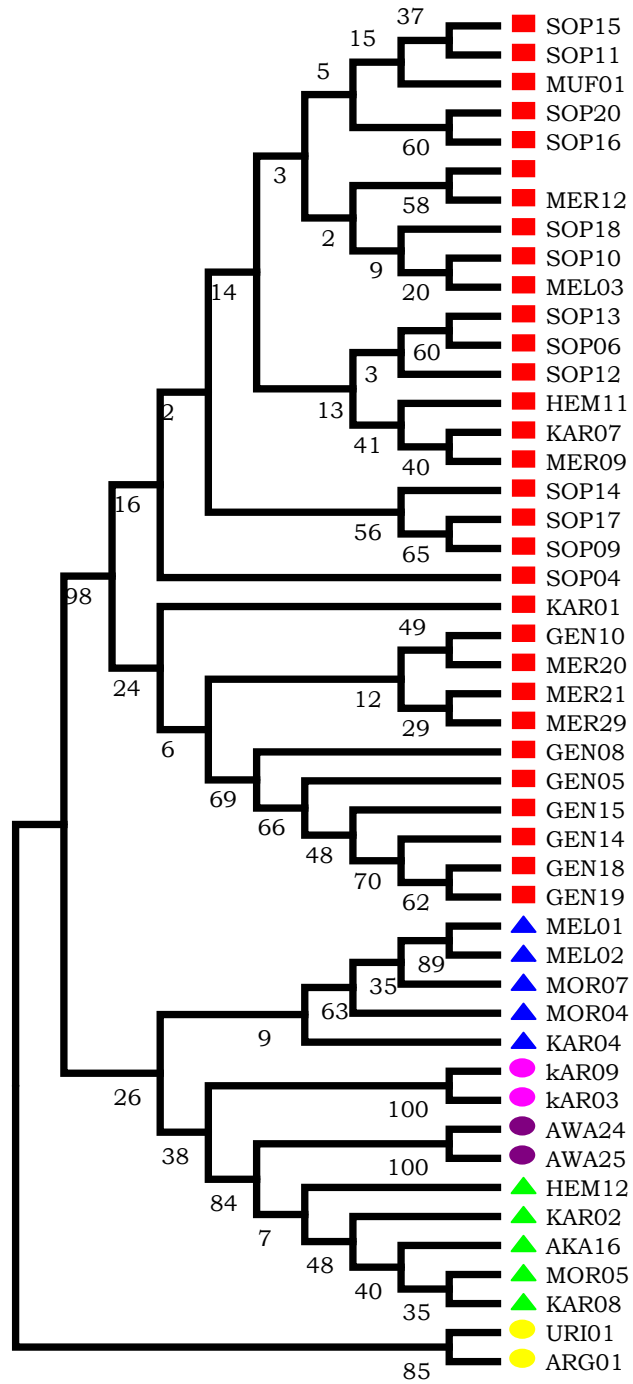


Figura 14: Neighbor Joining con metodo P-Distance evidenziando gli aplogruppi.

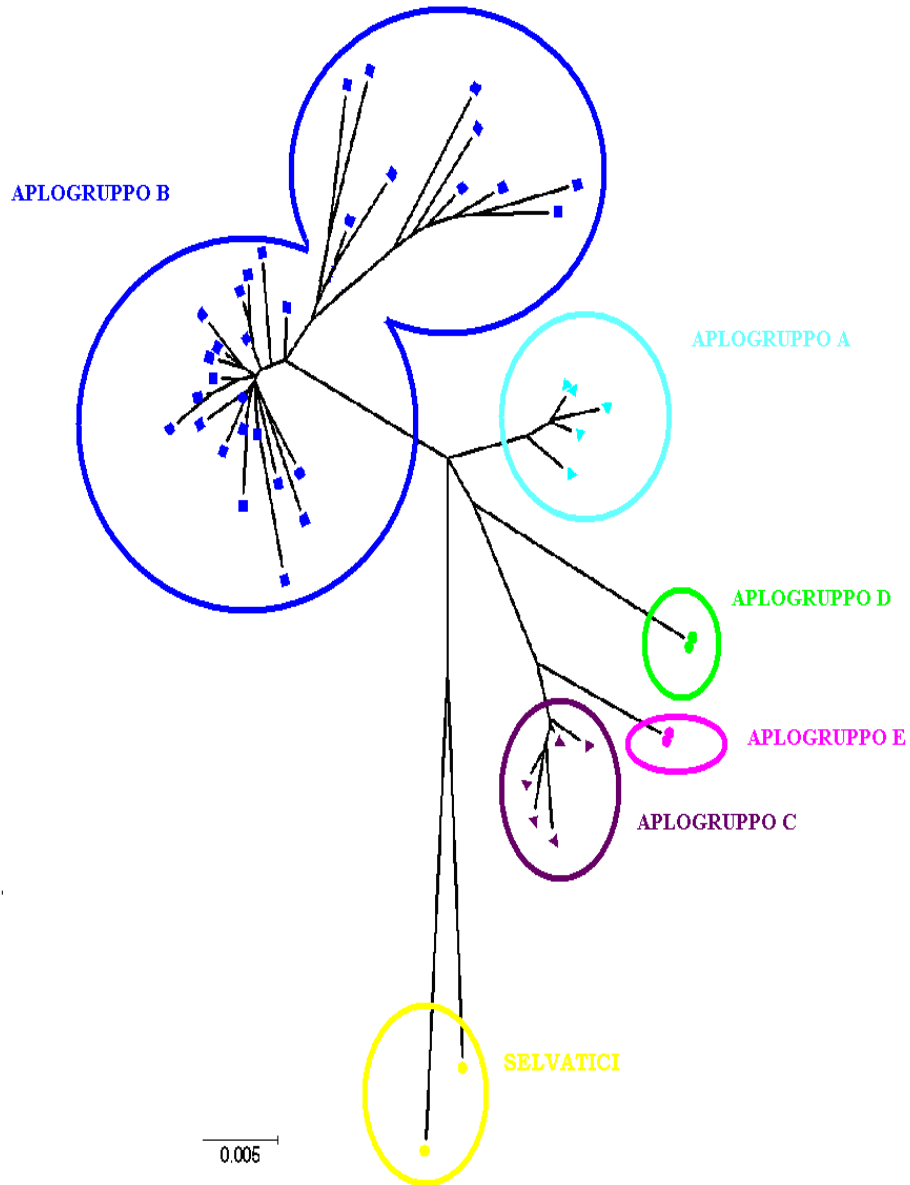


Figura 15: Median_Joining Network

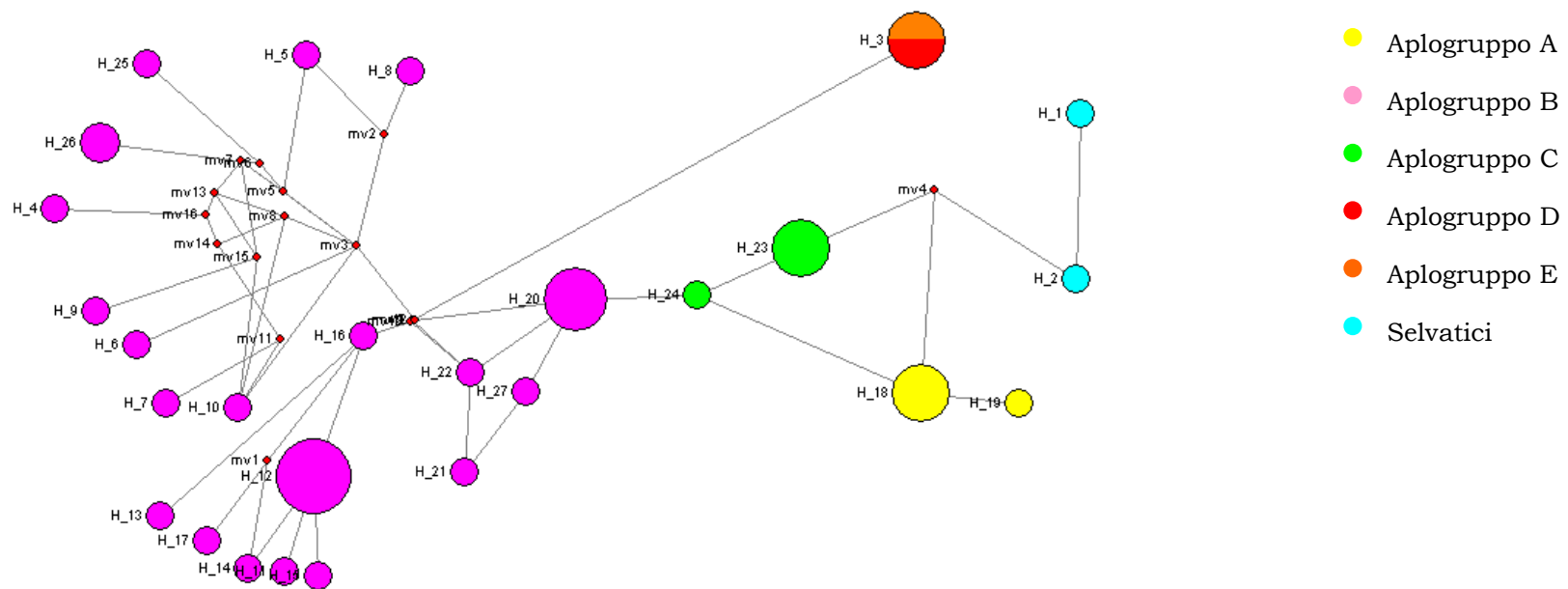


Figura16: Localizzazione degli aplotipi

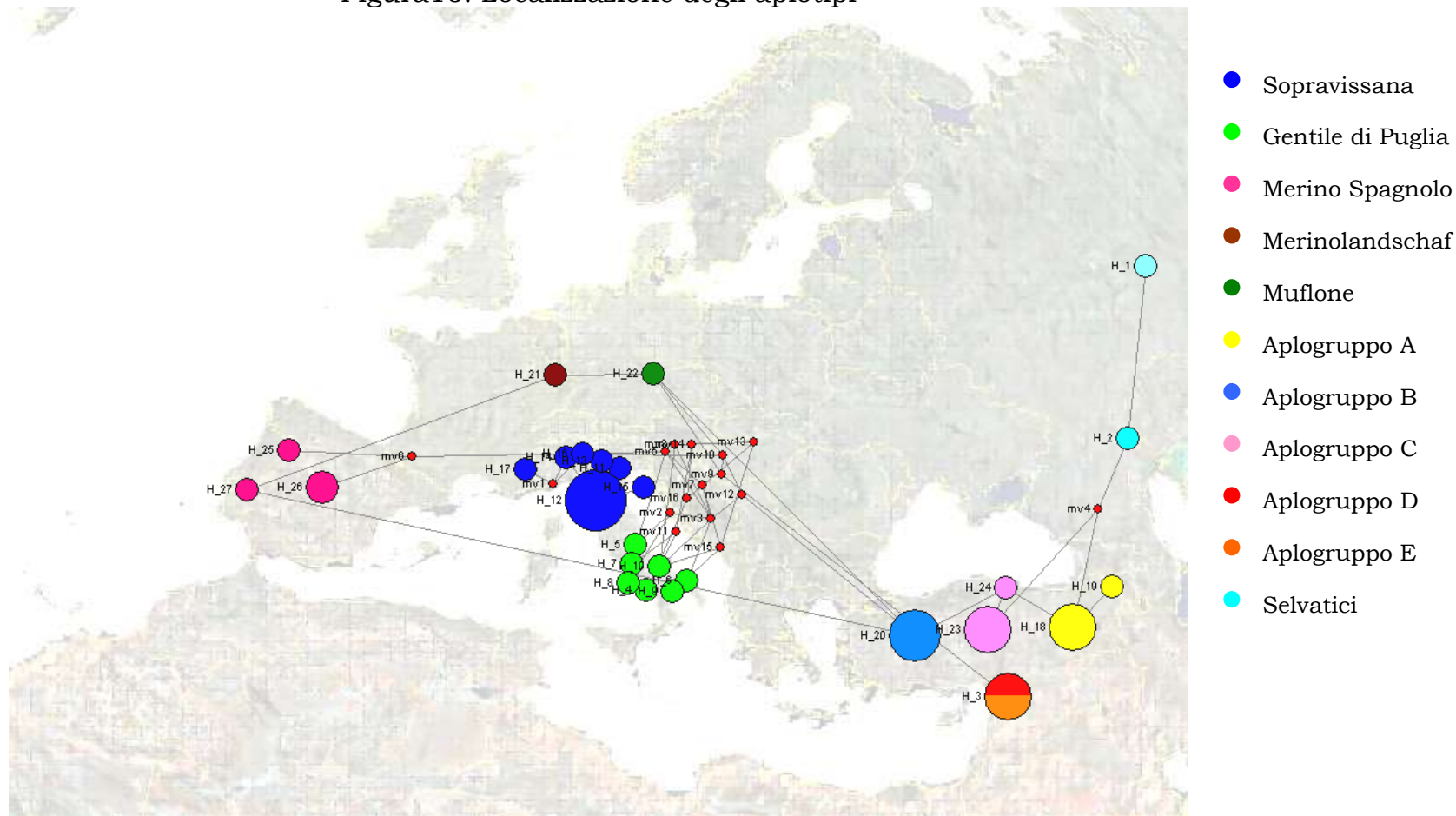


Tabella 11: Matrice delle distanze con metodo Tamura-Nei

RAZZA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
selvatici													
karakas	0,05751												
awassi	0,04901	0,03208											
gentile	0,06504	0,04843	0,05087										
sopravissana	0,05263	0,03669	0,04251	0,02308									
morkaraman	0,04666	0,03035	0,02276	0,04342	0,03069								
karayaka	0,04833	0,03069	0,02489	0,03425	0,02257	0,02156							
Merinolandschaf	0,04728	0,03256	0,03263	0,03450	0,01950	0,01881	0,02092						
tuj	0,05247	0,03365	0,04376	0,02561	0,01051	0,03214	0,02540	0,02015					
hemsin	0,05071	0,03446	0,02806	0,03297	0,02145	0,02529	0,02061	0,02364	0,02491				
muflone	0,05403	0,03365	0,04036	0,02528	0,01024	0,02871	0,02200	0,02009	0,01256	0,02152			
akkaraman	0,05240	0,03368	0,01734	0,04633	0,04100	0,02453	0,02340	0,03540	0,04553	0,02495	0,03869		
merinospagnol	0,05841	0,03928	0,04125	0,02324	0,01333	0,03342	0,02504	0,02398	0,01512	0,02359	0,01513	0,04029	

Tabella12: Valori dell'AMOVA in differenti cluster geografici e razziali espressi come percentuale della varianza totale

RAGGRUPPAMENTI	% DELLA VARIANZA	P-VALUE
Europa Vs resto del mondo	20,59	*****
Italia Vs resto del mondo	10,29	n.s.
Italia Vs Germania	-4,27	n.s.
Italia Vs Spagna	-27,64	n.s.
Italia Vs Asia	20,17	n.s.
Merino Vs resto del mondo	18,08	***

**** altamente significativo

*** significativo

n.s. non significativo

BIBLIOGRAFIA

- [1] ANALLA M. ~ MONTILLA J. M. ~ SERRADILLA J. M. "*Analyses of lamb weight and ewe litter size in various lines of Spanish Merino sheep*" - Small Ruminant Research (1998) 29: 255~259
- [2] BALLARD J. W. O. "*When one is not enough: introgression of Mitochondrial DNA in Drosophila*" - Molecular Biology and Evolution (2000) 17: 1126-1130
- [3] BANDELT H.-J.~ FORSTER P. RÖHL. "*A. Median-Joining Networks for inferring intraspecific Phylogenies*" - Molecular Biology and Evolution. (1999) 15: 37-48
- [4] BECKER M. W. ~ KLEINSMITH L. J. ~ HARDIN J. "*El mundo de la célula*" - Pearson-Addison Wesley. 6a edizione. Pag 9-12.
- [5] BERGSTROM C. T. ~ PRITCHARD J "*Germline Bottlenecks and the evolutionary maintenance of mitochondrial genomes*" - Genetics (1998) 149: 2135-2146
- [6] BROWN W. M. ~ GEORGE M. JR ~ WILSON A. C. "*Rapid evolution of animal mitochondrial DNA*" - Proceedings of the National Academy Of Sciences of USA (1979) 76: 1967-1971
- [7] BROWN W. M ~ WRIGHT J. W. "*Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic lizard*" - Science (1979) 203: 1247-1249

- [8] BRUFORD M. W. ~ BRADLEY D. G. ~ LUIKART G. "*DNA markers reveal the complexity of livestock domestication*" - *Genetics* (2003) 4: 900-910
- [9] BUROKER N. E. ~ BROWN J. R. ~ GILBERT T. A. ~ O'HARA P. J. ~ BECKENBACH A. T. ~ THOMAS W. K. ~ SMITH M. J. "*Length Heteroplasmy of Sturgeon Mitochondrial DNA: An Illegitimate Elongation Model*" - *Genetics* (1990)124: 157-163
- [10] CHEN S.-Y. ~ DUAN Z.-Y. ~ SHA T. XIANGYU J. ~ WU S.-F. ~ ZHANG Y.-P. "*Origin, genetic diversity, and population structure of Chinese domestic sheep*" - *Gene* (2006) 376: 261-223
- [11] COLUMELLA "*De re rustica*" VII, 5-7
- [12] COOPER G. M. "*La célula*" - Marbán. 2° edizione. Pag 388-402.
- [13] DELGADO J. V. ~ SIERRA A. C. ~BARAJAS F. ~ MOLINA A. ~. RODERO E. ~BARBA C. "*Evolucion zootecnica del Merino Espanol en tiempos recientes y futuros*". *Archivos de zootecnia* (1998) 47: 255-258.
- [14] DELL'AQUILA S. ~ PIERAMATI C. ~ RENIERI A. "*Indagini fenotipiche e genetiche sul peso alla nascita~ 30~ 60~ 90 e 120 gg. di agnelle di razza Gentile di Puglia*" (1995) - *Agricoltura Ricerca*"~ 159: 117~121.
- [15] DILLON M. C. ~ WRIGHT J. M. "*Nucleotide sequence of the D-loop region of the sperm whale (Physeter macrocephalus)*

mitochondrial genome" Molecular Biology and Evolution (1993) 10: 296-305

- [16] DODA J. N. ~ WRIGHT C. T. ~ CLAYTON D. A. "*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 USA (1981) 78: 6116-6120.
- [17] DOUZERY E.J.P. "*Evolutionary dynamics and phylogenetics of the mitochondrial control region of the Bovidae ruminants*" - NBCI (2000)
- [18] ESTEBAN M. "*Razas Ganadera Espanola II. Ovinas.*" Ministerio de Agricultura Madrid (2004)
- [19] EXCOFFIER L. "*Computational and molecular population genetics lab cmpg*"- Zoological institute University of Berne (2006)
- [20] EXCOFFIER L. ~ YANG Z. "*Substitution rate variation among sites in mitochondrial hypervariable region I of humans and chimpanzees*" - Molecular Biology and Evolution (1999) 16: 1357-1368
- [21] FAJARDO V. ~ GONZALEZ I. ~ LOPEZ-CALLEJA I. ~ MARTIN I.~ ROJAS M. ~ PAVON M.A. ~ GARCIA T. ~ HERNANDEZ P.E. AND MARTIN R. "*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 (2007) 76: 644-652

[22] GIUFFRA E. ~ KIJAS J. M. H. ~ AMARGER V. ~ CARLBORG Ö. ~ JEON J. T. ~ ANDERSON L. *"The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression"* - Genetics (2000) 154: 1785-1791

[23] HA J. M. ~ CHUNG H. Y. *"Haplotype analysis of ovine mt DNA for growth traits"* - NBCI (2004)

[24] HIENDLEDER S. ~ KAUPE B. ~ WASSMUTH R. ~ JANKE A. *"Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies."* - Proceedings Biological Sciences (2002) 269: 893-904.

[25] HIENDLEDER S. ~ LEWALSKI H. ~ WASSMUTH R. ~ JANKE A. *"The complete mitochondrial DNA sequence of domestic sheep(Ovis aries) and comparison with the major ovine haplotype"*- Journal of Molecular Evolution (1998) 47: 441-448.

[26] HIGGINS D. ~ THOMPSON J. ~ GIBSON T. ~ THOMPSON J.D.~ HIGGINS D.G.~ GIBSON T.J. *"CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice."* - Nucleic Acids Research (1994) 22: 4673-4680

- [27] HUNDERTMARK K.J. ~ SHIELDS G.F. ~ UDINA I.G. ~ BOWYER R.T. ~ DANILKIN A.A. ~ SCHWARTZ C.C. *"Mitochondrial phylogeography of moose (Alces alces): late pleistocene divergence and population expansion"* - Molecular Phylogenetic Evolution (2002) 22: 375-387
- [28] KING T. C. ~ LOW R. L. *"Mapping of control elements in the displacement loop region of bovine mitochondrial DNA"* - The Journal of Biological Chemistry (1987) 262: 6204 - 6213
- [29] KLEIN J. *"The Mesta: A Study in Spanish Economic History"* - (1920) 1273-1836
- [30] KUMAR S ~ TAMURA K ~ NEI M *"MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings in Bioinformatics"* (2004) 5: 150-163.
- [31] LARIZZA A. ~ PESOLE G. ~ REYES A. ~ SBISÀ E. ~ SACCONI C. *"Lineage Specificity of the Evolutionary Dynamics of the mtDNA D-Loop Region in Rodents"* - Journal of Molecular Evolution (2002) 54: 145-155.
- [32] LOFTUS R. T. ~ MACHUGH D. E. ~ BRADLEY D. G. ~ SHARP P. M. ~ CUNNINGHAM E. P. *"Evidence for two independent domestications in cattle"* - Proceedings of the National Academy Of Sciences of USA (1994) 91: 2757-2761
- [33] LUIKART G. ~ GIELLY L. ~ EXCOFFIER L. ~ VIGNE J.-D. BOUVET J. ~ TABERLET P. *"Multiple maternal origins and weak*

- phylogeographic structure in domestic goats*" - Proceedings of the National Academy Of Sciences of USA (2001) 98: 5927-5932
- [34] MALYARCHUK B. A. ~ ROGOZIN I. B. ~ BERIKOV V. B. ~ DERENKO M. V. ~ "*Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA region*" - Human Genetics (2002) 111: 46-53
- [35] MANNEN H.~ MORIMOTO M. ~TSUJI S. "*Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle*" - NCBI (2005)
- [36] MEADOWS J. R. S. ~ CEMAL I. ~ KARAKA O. ~ GOOTWINE E. ~ KIJAS J. W. "*Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the NearEst*" - Genetics (.2007) 175: 1371–1379.
- [37] MORIYAMA E. N. ~ POWELL J. R. "*Synonymous substitution rates in Drosophila: mitochondrial versus nuclear genes*" - Journal of Molecular Evolution (1997) 45: 378-391
- [38] NEGRINI G. "*La lunga storia delle razze merinizzate*"- Informatore Zootecnico" (1989) 8: 61-63
- [39] NEI M.~ KUMAR S. "*Molecular evolution and phylogenetics*". Oxford university press (2000) New York
- [40] PARDESHI V. C. ~ KADDOO N. Y. ~ SAINANI M, N. ~ MEADOWS J. R. S. ~ KIJAS J. W. ~ GUPTA V. S. "*Mitochondrial haplotypes reveal a strong genetic structure for three Indian sheep breeds*" - Animal Genetics (2007) 38: 460-466

- [41] PEDROSA S. ~ UZUN M. ~ ARRANZ J. J. ~ GUTIÉRREZ-GIL B. ~ SAN PRIMITIVO F. ~ BAYON Y. "*Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events*" - *Proceeding of the Royal Society* (2005) 272: 2211-2217
- [42] PENNY D. ~ STEEL M. ~ WADDEL P. J. ~ HENDY M. D. "*Improved analyses of human MtDNA sequences support a recent African origin for Homo sapiens*" - *Molecular Biology and Evolution* (1995) 12: 863-882
- [43] POLLIDORI P. ~ PANELLA F. ~ MORBIDINI L. "*Indagine conoscitiva sulla situazione delle razze ovine merinizzate*" - da *Economia montana: "linea ecologica"* (1989)
- [44] RYDER M. L. "*Sheep. Evolution of domesticated animals*" - Longman (1984) pag63-85
- [45] ROZAS J. J. C. ~ SANCHEZ-DELBARRIO X. M. ~ ROZAS R. "*DNA_{sp}, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods*" - *Bioinformatics* (2003) 19: 2496-2497
- [46] ROZEN S. ~ SKALETSKY H. J. "*Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*" (Krawetz S, Misener S eds) *Bioinformatics Methods and Protocols - Methods in Molecular Biology*. Human Press, (2000) 365-386
- [47] SACCONI. C. ~ LANAVE C. ~ PESOLE. G. ~ SBISA` E. "*Peculiar features and evolution of mitochondrial genome in mammals. In: Mitochondrial DNA in Human Pathology*" (S. Di Mauro

and D. Wallace. Eds.) – Raven Press. Ltd. New York. (1993) 27-37

- [48] SAITOU N. ~ NEI M. “ *The Neighbour-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*”. *Molecular biology and Evolution* (1987) 4: 406-425.
- [49] SARTI D. M. “ *Le razze derivate Merinos ad attitudine carne nel centro sud Europeo*” *L'allevatore di ovini e caprini* (1996) 7/8: 1-2.
- [50] SBISA` E ~ TANZARIELLO F. ~ REYES A. ~ PESOLE G. ~ SACCONI C “ *Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: Identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications*” *Gene* (1997) 205:125-140
- [51]
- [52] SIGURÐARDÓTTIR S ~ HELGASON A. ~ GULCHER J. R. ~ STEFANSSON K ~ DONNELLY P. “ *The mutation rate in the human mtDNA control region.*” – *The American Journal of Human Genetics* (2000) 66: 1599-1609.
- [53] TAMURA K.~ NEI M. “ *Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees*” - *Molecular Biology and Evolution* (1993) 10: 512-526
- [54] TAPIO M. ~ MARZANOV N. ~ OZEROV M.~ CINKULOV M. ~ GONZARENKO G.~ KISELYOVA T. ~ MURAWSKI M.~ VIINALASS H. ~ KANTANEN J. “ *Sheep Mitochondrial DNA Variation in*

- European. Caucasian. And Central Asian Areas*" – Molecular Biology and Evolution (2006) 23: 1776-783.
- [55] TORTORELLI N. "*Zootecnica speciale*" – Edagricole Bologna (1984)
- [56] VILA C. ~ LEONARD J. A. ~ GÖTHERSTRÖM A. ~ MARKLUND S. ~ SANDBERG K. ~ LIDEN K. ~ WAYNE R ~ ELLEGREN H. "*Widespread origins of domestic horse lineages*" – Science (2001) 291: 474-477.
- [57] WALBERG M. W. ~ CLAYTON D. A. "*Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA*" – Nucleic Acids Research (1981) 24: 5411-5421
- [58] WU C. ~ ZHANG Y. ~ BUNCH T.D. ~ WANG S. ~ WANG W. "*Molecular classification of subspecies of Ovis ammon inferred from mitochondrial control region sequences*" – Mammalia (2006) 67: 109-118
- [59] ZARDOYA R ~ VILLALTA M. ~ LOPEZ-PEREZ M. J. ~ GARRIDO-PERTIERRA A. ~ MONTOYA ~ BAUTISTA J. M. "*Nucleotide sequence of the sheep mitochondrial DNA D.Loop and its flanking tRNA genes*"- Current Genetic (1995) 28: 94-96
- [60] ZEUNER F. E. "*A history of domesticated animals*" – Hutchinson (1963) London

RINGRAZIAMENTI

Qui comincia la parte accademicamente meno importante ma, per me, importantissima: i ringraziamenti.

Desidero iniziare ringraziando mamma e papà per tutto quello che mi hanno dato finora, dal sostegno alle possibilità e, perchè no, anche le critiche che mi hanno regalato per farmi crescere e diventare una persona in gamba...Non so se ci sono, ma ci sto lavorando!

Rimanendo sempre in famiglia, ringrazio Alessandro e Tommaso, i miei fratelli: anche se sono due orsi so che mi vogliono bene.. e questo basta per ringraziarli!

Allargando il cerchio, ma rimanendo sempre nel mio cuore, c'è Alessio, cosa posso dire? Ci sono così tante cose per cui ti dovrei ringraziare...una su tutte: ci sei sempre, in ogni momento bello o brutto o semplicemente così così, mi stai vicino e mi dai sempre la carica e mi sproni a fare del mio meglio nonostante la mia pigrizia...a te va il mio grazie più grande e tutto il mio amore.

Ora gli amici...Una su tutti: Laura, con te ho vissuto l'esperienza fantastica dell'Erasmus, sono felice di conoscerti e di aver condiviso quasi 6 anni di vita all'Università....Come ti già detto più di una volta, ci sono stati dei periodi che ho visto più te che Ale! Ti voglio tanto bene e ti ringrazio di avermi sopportato!!

Grazie a Matteo e Tiziano, li conosco dalle superiori e nonostante siano in giro per il mondo a lavorare, mi hanno sempre dato moltissimo affetto, pettegolezzi e tanta amicizia. Insieme a voi ringrazio anche Antonella e Valentina, vi conosco da poco ma già vi voglio bene!

Tornando all'Università Maria ed Elisabetta, anche se quest'anno siamo state poco insieme rispetto ai nostri canoni, vi voglio bene e vi ringrazio per la vostra amicizia!

Grazie a Chiara, la nostra amicizia dura nonostante la distanza, a Bitta, alle persone che ho conosciuto in Spagna, soprattutto al Professor Juan Vicente Delgado, ad Alejandro Cabello Robles ed Amparo Martinez Martinez. Grazie alle loro famiglie che con disponibilità ed amicizia non ci hanno mai fatto sentire lontano da casa; grazie alle persone che ho incontrato all'università in questi anni.

Ringrazio nonna Anna, gli zii Angela, Anna, Emilia, Lucia, Nicola, Pasquale e Salvatore e i cugini Adriano, Gianluca e Massimo per il vostro affetto!

Un grazie enorme a Vincenzo, che oltre che essere un amico, è la persona senza cui questa tesi non esisterebbe. Grazie per la tua amicizia per la tua santa pazienza e disponibilità!

Ringrazio ancora la Professoressa Sarti ed il Professor Panella per avermi dato l'opportunità dell'esperienza Erasmus in Spagna e ad Emiliano per avermi aiutato nella correzione della tesi con pazienza e dedizione.