



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Scuola di Dottorato in
**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E
SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**
Direttore Prof. Giovanni Garippa

Indirizzo in
RIPRODUZIONE, PRODUZIONE E BENESSERE ANIMALE (XXII ciclo)
Coordinatore: prof. Sergio Ledda

**Valutazione della possibilità di utilizzo del DNA estratto da
campioni di latte dei controlli funzionali per l'attribuzione della
paternità tramite Microsatelliti nei piccoli ruminanti**

Docente guida
Chiar.mo Prof. Salvatore Naitana

Tutor
Dott.ssa Sara Casu
Agris-Sardegna (DIRPA)

Direttore
Prof. Giovanni Garippa

Tesi di Dottorato della
Dott.ssa Lia Crasta

Anno Accademico 2008/2009

INDICE GENERALE

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | Introduzione | 1 |
| 1.1 | Apporti della genetica molecolare alla gestione genetica delle popolazioni zootecniche | 1 |
| 1.1.1 | Miglioramento genetico degli animali in produzione zootecnica | 1 |
| 1.1.1.1 | Selezione quantitativa classica | 2 |
| 1.1.1.2 | Selezione assistita da marcatori o da geni | 6 |
| 1.1.2 | La salvaguardia delle risorse genetiche di interesse zootecnico..... | 10 |
| 1.1.3 | Tracciabilità | 14 |
| 2 | Strumenti della genetica molecolare | 16 |
| 2.1 | Banca di DNA | 16 |
| 2.2 | Matrici biologiche per l'estrazione di DNA | 18 |
| 2.2.1 | Sangue | 19 |
| 2.2.2 | Bulbo | 19 |
| 2.2.3 | Latte | 19 |
| 2.2.3.1 | Cenni sulla composizione del latte: | 19 |
| 2.2.3.2 | Cellule somatiche | 21 |
| 2.2.3.2.1 | Variazioni del Contenuto in Cellule Somatiche (CCS)..... | 22 |
| 2.2.3.3 | Il latte come matrice biologica per l'estrazione del DNA..... | 23 |
| 2.3 | Metodiche di estrazione del DNA | 24 |
| 2.3.1 | Generalità: | 24 |
| 2.3.1.1 | Lisi cellulare. | 25 |
| 2.3.1.2 | Inattivazione delle nucleasi cellulari | 26 |
| 2.3.1.3 | Separazione e il recupero dell'acido nucleico | 26 |
| 2.3.1.4 | Precipitazione | 27 |
| 2.3.1.5 | Risospensione | 27 |
| 2.3.2 | Metodologie classiche per l'estrazione del DNA | 27 |
| 2.4 | Quantificazione del DNA | 28 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.4.1 | Valutazione della concentrazione di DNA attraverso metodo elettroforetico su gel d'agarosio | 28 |
| 2.4.2 | La tecnica spettrofotometrica | 29 |
| 2.5 | Polymerase Chain Reaction (PCR) | 30 |
| 2.6 | I marcatori molecolari | 31 |
| 2.6.1 | Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) | 32 |
| 2.6.2 | Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) | 34 |
| 2.6.3 | Short Tandem Repeat (STR o Microsatelliti)..... | 36 |
| 2.6.4 | Single Nucleotide Polymorphism (SNP)..... | 38 |
| 3 | Cenni sulla Selezione in Italia | 41 |
| 3.1 | Schemi di selezione dei piccoli ruminanti..... | 41 |
| 3.1.1 | Schema di selezione razza ovina Sarda: | 42 |
| 3.1.2 | Schema di selezione della capra Sarda | 47 |
| 4 | Scopo del lavoro | 50 |
| 5 | Materiale e Metodi..... | 52 |
| 5.1 | Laboratorio Associazione Regionale Allevatori (A.R.A.) | 52 |
| 5.2 | Estrazione del DNA dai leucociti delle cellule somatiche del latte..... | 53 |
| 5.2.1 | Metodi di estrazione del DNA disponibili e loro confronto..... | 53 |
| 5.2.1.1 | Metodica salina (D'Angelo et al., 2007). | 54 |
| 5.2.1.2 | Metodica salina (Ernst e Dentine, 1992; Aleandri et al., 1994). | 54 |
| 5.2.1.3 | Metodica rapida | 55 |
| 5.2.1.3.1 | Metodica rapida su Sangue..... | 56 |
| 5.2.1.3.2 | Metodica rapida Bulbo pilifero | 56 |
| 5.4 | Metodiche di estrazione testate..... | 57 |
| 5.2.2 | Esperimento 1:..... | 58 |
| 5.2.3 | Esperimento 2 | 60 |
| 5.3 | Quantificazione del DNA | 63 |
| 5.3.1 | Analisi attraverso corsa elettroforetica su gel d'agarosio..... | 63 |
| 5.3.2 | Analisi allo spettrofotometro | 63 |
| 5.3.3 | Analisi molecolari | 65 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 5.4 | Messa a punto di un sistema di marcatori per l'attribuzione delle paternità nella razza Sarda..... | 65 |
| 5.4.1 | Organizzazione dei microsatteliti in multiplex..... | 67 |
| 5.4.2 | Stima della probabilità di attribuzione della paternità..... | 75 |
| 6 | Risultati..... | 76 |
| 6.1 | Il latte come matrice biologica: | 76 |
| 6.1.1 | Scelta della metodica d'estrazione : esperimento 1 | 76 |
| 6.1.2 | Scelta della metodica d'estrazione : esperimento 2..... | 78 |
| 6.1.2.1 | Quantificazione elettroforetica su gel d'agarosio..... | 80 |
| 6.1.2.2 | Quantificazione spettrofotometrica con il NanoDrop | 80 |
| 6.1.2.3 | Quantità di DNA estratto..... | 81 |
| 6.1.2.4 | Valutazione dei rapporti 260nm/280nm e 260/230..... | 86 |
| 6.1.2.4.1 | Analisi molecolari | 87 |
| 6.2 | Messa a punto di un sistema per l'attribuzione della paternità negli ovini di razza Sarda | 88 |
| 6.2.1 | Descrizione del panel di marcatori disponibili e scelta dei microsatteliti più informativi | 88 |
| 6.2.2 | Organizzazione in multiplex..... | 91 |
| 6.2.2.1 | Opzione 1..... | 92 |
| 6.2.2.2 | Opzione 2: | 94 |
| 6.2.2.3 | Opzione 3..... | 95 |
| 6.2.3 | Applicazione delle multiplex al DNA estratto da cellule somatiche del latte .. | 97 |
| 6.2.4 | Potenza dei microsatteliti scelti per l'attribuzione della paternità..... | 98 |
| 7 | Discussione e conclusioni..... | 102 |
| 8 | Bibliografia | 107 |

INDICE DELLE TABELLE E FIGURE

Indice delle Tabelle:

Tabella 5.1. Microsatelliti, sequenza e marcatura fluorescente dei primer, taglia dell'amplificato e relativi riferimenti bibliografici

Tabella 5.2. Valori del tenore in grasso, in proteine totali, delle CCS e pH dei campioni di latte ovino processati con la metodica rapida 2.

Tabella 5.3. Microsatelliti, sequenza dei primer e relativi riferimenti bibliografici

Tabella 6.1. Identificativo del campione, pH del latte ovino, pH DNA estratto con la metodica rapida 2.

Tabella 6.2. Identificativo del campione di latte ovino e la concentrazione del DNA estratto dal latte refrigerato con la metodica rapida

Tabella 6.3. Identificativo del campione di latte ovino e la concentrazione del DNA estratto dal latte precedentemente congelato

Tabella 6.4. Identificativo del campione di latte ovino e la concentrazione del DNA estratto con il kit commerciale NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) dal latte precedentemente congelato

Tabella 6.5. Medie \pm deviazioni standard della concentrazione del DNA e dei rapporti di assorbanza dei campioni estratti con la metodica rapida 2 (da latte refrigerato e congelato) e con il kit Nucleospin analizzati al NanoDrop.

Tabella 6.6. Sub-set composto dai 12 microsatelliti più informativi tra i 145 del panel del progetto "Genesheepsafety"; OAR=cromosoma ovino, n = numero di figlie con genotipo informativo, Na: numero di alleli veri; Ne numero alleli effettivi, He= eterozigosità attesa, Pe=probabilità di esclusione della paternità.

Tabella 6.7. Condizioni di amplificazione dei microsatelliti, temperature di annealing (Ta), effettive taglie dei prodotti e possibili marcature fluorescenti.

Tabella 6.8. Le tre multiplex finali con n.dei microsatelliti, le rispettive marcature fluorescenti. le taglie effettive dei loro prodotti e (Ta) temperature di annealing.

Tabella 6.9 Percentuali di attribuzione di paternità univoca ottenute con le simulazioni utilizzando in successione le multiplex 1 2 3

Indice delle Figure:

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Fonte: www.racine.ra.it/biotecnologie/img/pcr1.jpg

Figura 2.2. Figura 2.2 Esempio di gel PCR-RFLP: nella colonna 1-2 le bande non sono state tagliate e migrano in corrispondenza del marker-DNA pari a 98bp, perciò si parla di omozigosi, nella colonna 3 la banda viene tagliata e le rispettive migrazioni si trovano in corrispondenza del marker-DNA pari a 131bp e 98bp, e quindi eterozigosi, in corrispondenza della colonna 4 un altro caso di omozigosi con la migrazione della banda in corrispondenza del marker-DNA pari a 131bp, infine nella colonna 7 il marker-DNA marker di taglia nota

Fonte: www.biomedcentral.com//1471-2407-8-50-2-l.jpg

Figura 2.3. Schema della tecnica degli AFLP. Fonte: <https://mmg/835/snapshot.afs/DNAmarkers>

Figura 2.4. Polimorfismo di un microsatellite: n.4 ripetizioni tetra nucleotidiche (A) e n.6 ripetizioni tetra nucleotidiche (B).

Figura 2.5. Esempio di una sostituzione nucleotidica (SNP); Fonte: science.marshall.edu//416px-Dna-SNP_svg.png

Figura 3.1. Diagramma degli schemi di selezione negli ovini da latte

Figura 5.1. Strumento spettrofotometrico NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technology)

Figura 5.2. Schema del sistema di rilevazione della fluorescenza su un sequenziatore automatico- I frammenti fluoriscinati migrano in base al loro peso molecolare Il laser eccita la molecola fluorescente che riemette luce ad una particolare lunghezza d'onda rilevata da uno spettrografo e tradotta in colore.

Figura 5.3. Rappresentazione della 5-PLEX analizzata con Genemapper™ (Applied Biosystems). I 5 microsatelliti sono stati marcati con i 4 fluorocromi disponibili: 1 Vic (Verde), 1 Fam (Blu), 1 Pet (Rosso) e 2 Ned (Giallo).

Figura 5.4. Dettaglio della Figura 5.3. che mette in evidenza 2 microsatelliti che presentano taglia allelica sovrapposta e che di conseguenza sono stati marcati con 2 diversi fluorocromi. (Ned e Vic).

Figura 5.5. Esempio di analisi per l'attribuzione delle taglie alleliche utilizzando il software Genemapper™ (Applied Biosystems).

Figura 6.1. Frequenza e numero di microsatelliti del panel di “genesheepsafety” in funzione del numero effettivo di alleli

Figura 6.2 Range di amplificazione per ciascun microsatellite ottenuto sulla base dei genotipi di 96 arieti di razza Sarda.

Figura 6.3. Opzione 1: un sistema di 2 multiplex-PCR con rispettive marcature fluorescenti attribuite a ciascun microsatellite.

Figura 6.4. Opzione 2: un sistema di 2 multiplex-PCR con le rispettive marcature fluorescenti attribuite a ciascun microsatellite.

Figura 6.5. Opzione 3: un sistema di 2 multiplex-PCR con le rispettive marcature fluorescenti attribuite a ciascun microsatellite.

Abstract

The aims of the present work were to get ready an economic, rapid and toxic solvent-free method to extract DNA from sheep milk somatic cells and to set up a system of microsatellites for paternity assignment in Sarda sheep breed. During the years, several techniques which describe the isolation of genomic DNA from somatic cells of cow and goat milk have been reported. Milk is preferred to blood as a source of DNA because its collection is routinely performed, less expensive and more easily accomplished than blood collection. Moreover milk use limits stressful practices such as capture, handling and venipuncture in animal management. A rapid alkaline method resulted most suitable as method for DNA extraction from sheep milk because fast and economic.

Genomic DNA was extracted from somatic cells starting from 20 ml of sheep milk and used as substrate for the polymerase chain reaction. A system of 10 highly informative microsatellites (MCM058, LSCV06, BM6444, BMS2213, CSSM43, BMS2252, MCM120, OLADRB, MCM373, BMS0360) was chosen and spread in 3 multiplex for paternity assignment in the Sarda breed. The proposed system would be a useful alternative to traditional pedigree recording in the Sarda breed. Not only it had a high probability of excluding incorrect parental ($P_e=0.99996$) relationships but it also provided a high percentage of unequivocal paternity assignment ($P=1.0$ in a simulated population). Its regular utilization would increase the number of individuals with known ancestors in the Sarda breed, with favorable consequences on the number of genetically evaluated animals and the precision of their breeding values estimation.

VII

Nome Autore: Lia Crasta

Titolo: Valutazione della possibilità di utilizzo del DNA estratto dai campioni di latte dei controlli funzionali per l'attribuzione della paternità tramite Microsatelliti nei piccoli ruminanti.

Tesi: Dottorato in Riproduzione Produzione e Benessere Animale, Università degli Studi di Sassari

1. INTRODUZIONE

1 Introduzione

1.1 Apporti della genetica molecolare alla gestione genetica delle popolazioni zootecniche

Negli ultimi decenni le tecnologie di analisi del DNA hanno raggiunto notevoli progressi nel settore della genetica animale, mettendo a disposizione gli strumenti per la caratterizzazione del genoma delle singole specie e per l'identificazione di geni con un effetto rilevante sulle produzioni zootecniche. Tali strumenti possono rappresentare un valido aiuto per la gestione genetica delle popolazioni animali, sia per quanto concerne il miglioramento dei caratteri di interesse economico, che per studiare la diversità delle razze allevate al fine di preservare la biodiversità. Infatti la selezione esercitata nell'ultimo secolo ha condotto a una riduzione della consistenza dei tipi genetici autoctoni con un elevato rischio di estinzione e conseguente perdita di variabilità genetica.

Nei paragrafi che seguono verranno presentati alcuni di questi aspetti con particolare riferimento agli ovini e caprini da latte allevati nel bacino del Mediterraneo.

1.1.1 Miglioramento genetico degli animali in produzione zootecnica

Il potenziale impatto della genetica molecolare sulla selezione può realizzarsi fondamentalmente sotto due punti di vista. Da un lato essa può consentire una maggiore efficacia degli schemi di selezione classici incrementando l'accuratezza delle valutazioni

genetiche o accorciando l'intervallo di generazione (Meuwissen e Goddard, 1996). Dall'altro, molte aspettative sono riposte nella possibilità di ridurre la necessità di misure individuali dei caratteri oggetto di selezione e basare la scelta degli individui da utilizzare per la procreazione della generazione successiva direttamente sulla conoscenza del loro genotipo a geni o marcatori di interesse.

1.1.1.1 Selezione quantitativa classica

L'attività di miglioramento genetico delle specie di interesse zootecnico ha ottenuto nella seconda metà del secolo scorso formidabili risultati. L'approccio utilizzato è stato, ed è tuttora per la maggior parte dei caratteri e delle specie, quello quantitativo classico (Falconer and Mackay, 1996). Esso postula che i caratteri oggetto di selezione siano determinati per la loro componente genetica da un numero infinito di geni, diffusi casualmente in tutto il genoma e con effetto additivo infinitesimale. L'applicazione di tale modello genetico viene realizzata attraverso l'utilizzo di una metodologia per la valutazione dei riproduttori detta BLUP - animal model che consente di ottenere la miglior stima possibile del valore genetico additivo di un individuo, attraverso la correzione del fenotipo, per gli effetti ambientali, e la considerazione di tutte le covarianze genetiche additive (derivate dalle parentele) tra animali. Fino a un passato recente, la selezione si è concentrata sui caratteri produttivi con il principale obiettivo di incidere sulla quantità di prodotto e solo marginalmente sulla sua qualità e sicurezza alimentare. Nell'ultimo ventennio, e perlopiù nella specie bovina, l'applicazione del modello infinitesimale si è estesa ad altri caratteri funzionali (facilità di parto, longevità funzionale, mungibilità e morfologia mammaria etc.). Recentemente, gli

organismi responsabili delle scelte selettive delle diverse specie e razze hanno dovuto rispondere alla crescente richiesta dei consumatori di prodotti di origine animale di sicura qualità igienico-sanitaria e di ottimale valore nutrizionale. Tali esigenze hanno portato a considerare la possibilità di introdurre tra gli obiettivi di selezione quelli legati alla resistenza degli animali alle malattie e alla composizione dei prodotti animali.

Dal punto di vista pratico l'applicazione del modello genetico classico necessita della raccolta delle seguenti informazioni:

- ✚ performance o misure fenotipiche degli animali
- ✚ dati anagrafici, al fine di poter considerare le covarianze attese tra individui dovute alle loro parentele
- ✚ tutti i dati utili a stimare correttamente il valore genetico degli animali stessi (data di nascita e di parto, allevamento, anno o momento di misura del fenotipo etc.).

L'organizzazione di uno schema di selezione richiede l'esistenza di un efficiente sistema di assistenza tecnica diffuso su tutto il territorio e la partecipazione degli allevatori, senza il cui contributo nessuna attività di miglioramento genetico è concepibile. La raccolta delle informazioni necessaria per avviare e gestire uno schema di selezione, ed in particolare la registrazione delle performance, presenta un costo considerevole, che deve essere rapportato alla redditività del singolo capo. Nei piccoli ruminanti, che hanno produzioni molto inferiori rispetto a quelle dei bovini, i costi della registrazione delle performance risultano particolarmente elevati rispetto al valore economico del singolo capo. Per tale motivo in molti paesi, Italia compresa, il costo dei controlli funzionali negli ovi - caprini è largamente sostenuto da finanziamenti pubblici. Inoltre nei sistemi di allevamento estensivi, quali quelli dei piccoli ruminanti allevati nel bacino del Mediterraneo, l'applicazione dei controlli

funzionali risulta difficoltosa anche quando questi vengano realizzati con strumentazioni non particolarmente evolute.

L'esatta identificazione degli animali e la correttezza delle loro genealogie costituisce tra l'altro un presupposto indispensabile per ogni efficace azione di miglioramento genetico. Infatti erronee o assenti informazioni genealogiche possono compromettere la precisione della stima dei parametri genetici di una popolazione e l'attendibilità della valutazione genetica (Visscher *et al.*,2002; Sanders *et al.*,2006). Nel caso di specie e sistemi di allevamento, in cui l'inseminazione artificiale costituisce il sistema riproduttivo predominante (come nell'allevamento intensivo della vacca da latte), o nel caso di piccoli allevamenti con un solo riproduttore maschio l'accertamento della paternità è immediato, anche se necessiterebbe sempre di essere verificato. Nel caso in cui l'allevamento presenti un elevato numero di capi, e quindi più riproduttori maschili, e/o l'inseminazione artificiale sia poco o per nulla praticata, l'attribuzione delle paternità può essere conseguita con buon margine di certezza solo facendo ricorso ai gruppi di monta, cioè isolando, durante il periodo riproduttivo un certo numero di femmine con un unico maschio al quale in seguito viene attribuita la paternità della progenie. Tale pratica risulta particolarmente gravosa per l'allevatore che si trova costretto a gestire piccoli gruppi di animali. La gestione dei gruppi di monta è ancora più difficile negli ovini e nei caprini che sono ancora in mungitura nel periodo riproduttivo e devono quindi essere quotidianamente spostati dalle zone di pascolo al centro aziendale.

La difficoltà della gestione dei gruppi di monta limita, di fatto, l'adesione degli allevatori allo schema di selezione, mentre la mancata conoscenza delle genealogie limita notevolmente la taglia effettiva della popolazione sottoposta a selezione. Tale carenza nella registrazione delle

informazioni genealogiche è in gran parte dovuta alle difficoltà insite nella gestione dei gruppi di monta.

Da questo punto di vista uno dei primi e più diffusi contributi della genetica molecolare al miglioramento genetico degli animali in produzione zootecnica è proprio la conferma della paternità, attraverso lo studio di marcatori molecolari neutri. A tale scopo i microsatelliti, che sono marcatori codominanti, rappresentano i markers di elezione (Heyen *et al.*,1997; Binns *et al.*,1995; Usha *et al.*,1995; Bowling *et al.*,1997; Luikart *et al.*,1999; Tozaki *et al.*,2001; Cho *et al.*,2003, 2004; Lee *et al.*,2006), anche se recentemente gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism; Dwight *et al.*,2000) sono stati proposti per tale scopo (Heaton *et al.*, 2002). Generalmente l'uso dei marcatori molecolari si limita all'esclusione della paternità se il genotipo a uno o più marcatori dell'individuo risulta incompatibile con quella del padre presunto. Tuttavia, come dimostrato da Isberg *et al.*,(2004) e Rohrer *et al.*,(2007), l'uso di marcatori molecolari può essere fondamentale anche per l'attribuzione delle relazioni di parentela tra gli individui. Come precedentemente esposto l'identificazione esatta della paternità, in soggetti che originano da accoppiamenti non controllati o da gruppi di monta con più riproduttori maschi, rappresenta un potente mezzo per migliorare le capacità decisionali e gestionali degli allevatori e dei selezionatori.

In ultima analisi, la possibilità di ricostruzione completa dei pedigree a partire dalle informazioni molecolari potrebbe permettere di affrancarsi dall'onerosa difficoltà di registrare gli accoppiamenti e i parti. Il genotipo della progenie potrebbe infatti essere determinato in qualsiasi momento della sua carriera produttiva. Inoltre la possibilità di ricostruire le genealogie a partire dalle informazioni molecolari permetterebbe la partenza più rapida di un eventuale programma di miglioramento genetico per una popolazione non precedentemente sottoposta a selezione (Van Arendok,2009). Come visto infatti, negli

schemi di selezione tradizionali, un certo tempo è necessario per accumulare informazioni genealogiche tali da consentire un accurata stima dei parametri genetici della popolazione (ereditabilità, correlazioni genetiche) e del valore genetico dei riproduttori. Tale intervallo potrebbe essere ridotto ricostruendo le relazioni di parentela tra individui le cui performance possono essere misurate. Simili vantaggi si avrebbero nella stima del valore genetico degli animali appartenenti ad allevamenti di prima iscrizione ai Libri Genealogici (e quindi di genealogia sconosciuta).

1.1.1.2 Selezione assistita da marcatori o da geni

La selezione assistita da marcatori o geni consiste nel basare la scelta degli individui da avviare alla riproduzione o da allevare sulla conoscenza del genotipo a loci di interesse. Le prime applicazioni in tal senso sono legate ai caratteri mendeliani. Per i bovini per esempio le analisi del DNA sono utilizzate per eliminare i difetti genetici quali il BLAD (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency, Shuster *et al.*,1992; Nagahata, *et al.*,1993; Geraldi,1996; Powell *et al.*,1996; Oner *et al.*,2001), la DUMPS (Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase, Akyuz and Ertugrul,2008), la CVM (Complex Vertebral Malformation, Schwenger *et al.*,1993; Gentile *et al.*,2004). Nei suini l'esempio più noto di selezione assistita da geni è quella per il gene dell'alotano (Fujii *et al.*,1991; Russo,1993). Negli ovini la selezione per la resistenza alla Scrapie costituisce il primo esempio di selezione fondata su informazioni molecolari (Elsen *et al.*,2002). La scoperta del locus genico (Hunter *et al.*,1997) che modula la resistenza alla malattia e la disponibilità di tecniche molecolari per l'individuazione del genotipo "high throughput" con relativo basso costo hanno consentito di avviare strategie di

controllo basate sulla selezione genetica, peraltro rese obbligatorie dalle normative europee (EC 2003).

La maggior parte dei caratteri di interesse economico in produzione animale sono tuttavia di natura quantitativa e sono influenzati da un gran numero di geni, dei quali alcuni con effetto maggiore, la maggioranza con effetto limitato (Le Roy *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 1994). Qualora il gene a effetto maggiore venisse identificato e qualora si rendesse disponibile un test molecolare il genotipo a tale locus può essere utilizzato per la selezione, in altri casi, una regione cromosomica vicina al gene di interesse può essere utilizzata in quanto marcatore di quest'ultimo.

Due approcci sperimentali sono fondamentalmente disponibili per la ricerca rispettivamente delle zone del genoma che influenzano i caratteri quantitativi (QTL per quantitative trait loci) o geni:

- genome scan
- gene candidato

Nel primo caso è necessario avere la disponibilità di marcatori molecolari anonimi (microsatelliti, SNPs) localizzati in tutto genoma in quantità tale da costituire un mappa di densità intermedia. La seconda condizione è che tra un marcatore (M) e un gene (Q) che influenza un carattere esista linkage disequilibrium (LD). Questo viene normalmente reperito nelle popolazioni in selezione all'interno di famiglie di mezzi fratelli. Infatti, se un genitore maschile è eterozigote a un locus marcatore è possibile ripartirne la progenie in due gruppi a seconda che abbiano ricevuto l'uno o l'altro segmento cromosomico e contrastarne i fenotipi

di interesse. Se il contrasto tra i due gruppi è statisticamente significativo se ne può trarre l'inferenza che nel segmento cromosomico adiacente il marcatore analizzato è presente un gene il cui polimorfismo influenza il carattere di interesse.

Approcci di questo tipo consentono normalmente l'individuazione di QTL con intervalli di confidenza della localizzazione abbastanza elevati che non ne consentono l'utilizzo immediato in selezione. Gli aplotipi di marcatori eventualmente associati a alleli positivi per un QTL hanno, infatti, un'associazione piuttosto debole con una percentuale di avvenimenti di ricombinazione talmente elevata da rompere l'associazione nel corso di poche generazioni. Questo tipo di marcatori vengono definiti linkage equilibrium markers (LE – markers) secondo Dekkers, (2003). Il loro utilizzo viene normalmente considerato di limitato impatto per il fatto che essi consentono la selezione degli individui portatori dell'aplotipo favorevole solo entro una singola famiglia e sono inoltre di costosa applicazione, in quanto la fase di associazione con l'allele favorevole del gene richiederebbe di essere continuamente verificata. Normalmente, si preferisce saturare la mappa delle regioni cromosomiche di interesse sino a 1-3 cM di intervallo tra marcatori per consentire una localizzazione più precisa del gene. Questi marcatori vengono definiti linkage disequilibrium markers (LD-markers). Il loro utilizzo in selezione sarebbe molto più efficace degli LE - markers in quanto, la forza del legame, e dunque le ridotte probabilità di ricombinazione, consente la scelta degli aplotipi favorevoli a livello di popolazione. Anche in questo caso, tuttavia, deve essere prevista una verifica dell'associazione tra aplotipo dei marcatori e allele favorevole al gene, anche se con intensità e frequenza inferiori rispetto al caso precedente.

La saturazione della mappa costituisce poi il passaggio obbligato per l'individuazione dei polimorfismi del gene associato al carattere. Solo dopo una localizzazione precisa è possibile infatti verificare quali geni di funzione nota sono mappati nelle regioni omologhe umane e

murine. La combinazione delle informazioni di localizzazione e funzione può condurre all'individuazione di geni candidati per posizione per i quali è possibile realizzare studi molecolari atti a individuarne le mutazioni responsabili degli effetti sul carattere. Tale approccio ha portato, nella specie bovina, all'identificazione del gene DGAT1 e della mutazione responsabile di un effetto molto importante sul tenore in grasso del latte (Grisart *et al.*,2002; Sanders *et al.*,2006). Attualmente, la selezione per la mutazione favorevole viene realizzata per i bovini da latte in parecchie nazioni.

Analoghi studi si stanno realizzando per la specie caprina, per la quale è stato individuato un SNP nell'introne 16 (Angiolillo *et al.*,2007), da correlare alle osservate differenze nel contenuto di grasso nel latte di tali specie. Anche nella pecora il gene DGAT1 è candidato per il contenuto di grasso nel latte, in quanto è stato individuato un QTL sul cromosoma 9 ovino, omologo al cromosoma 14 bovino (Barillet *et al.*,2005).

Esperimenti di questa natura sono in corso per la razza ovina Sarda (Carta,2005).

Recentemente, l'aumento delle conoscenze a livello del genoma animale e i progressi nell'ambito delle tecnologie applicate alla genetica molecolare hanno permesso di considerare con più interesse le mutazioni puntiformi del DNA, indicate come SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). Gli SNP sono i marcatori più diffusi nel genoma animale (uno ogni 500-1000 nucleotidi). Inoltre, si prestano ad essere analizzati mediante sistemi completamente automatizzati, detti high-throughput. Con la disponibilità di mappe genetiche ad alta densità si apre la prospettiva, a lungo auspicata dai genetisti, di riuscire a calcolare il valore genetico degli animali come la somma degli effetti sul carattere di interesse stimati per ciascuno dei numerosi polimorfismi o loro combinazione. Il potenziale vantaggio che ci si attende dalla completa applicazione di questo approccio sarebbe, stando ad alcune

modellizzazioni teoriche (Calus *et al.*,2008), la non necessità o l'estrema riduzione del numero di fenotipi necessari (Schaeffer,2006).

In conclusione, si può affermare che l'applicazione degli strumenti della genetica molecolare al miglioramento degli animali in produzione zootecnica costituisce un'interessante opportunità per la selezione di caratteri di onerosa misurazione in specie di limitato valore delle produzioni individuali (Pagnacco e Carta,2003). Ricerche accurate debbono ancora essere sviluppate al fine di quantificarne esattamente le potenzialità. La valutazione deve essere operata considerando opportunamente i vantaggi economici che se ne possono ottenere e i costi che si devono sostenere rispetto a un sistema che prevedesse, al contrario, l'approccio classico. La tendenza sembra comunque essere quella di un costante ribasso dei costi che si devono sostenere per la realizzazione di analisi di genetica molecolare mentre difficilmente quelli relativi alla misura su grande scala dei fenotipi potranno subire il medesimo andamento in quanto ancora fortemente dipendenti dalla mobilitazione di manodopera per la visita e l'esecuzione di prelievi o misure negli allevamenti oltrechè al costo di eventuali determinazioni analitiche.

1.1.2 La salvaguardia delle risorse genetiche di interesse zootecnico.

La salvaguardia della biodiversità del patrimonio vegetale ed animale è un argomento dibattuto ormai da tempo.

A causa dell'isolamento geografico che ha limitato il flusso genico tra gruppi di animali, e della selezione ambientale e antropica, si sono differenziate popolazioni con caratteristiche diverse, adattate ad ambienti anche estremi e con attitudini specifiche per la produzione di latte, carne o fibra. Nel corso degli ultimi due secoli molte di queste popolazioni sono state

progressivamente standardizzate per diversi caratteri morfologici e produttivi, sottoposte a maggiore pressione selettiva ed isolate dal punto di vista riproduttivo. Questo processo ha portato alla formazione delle razze come le conosciamo oggi ed alla frammentazione della variabilità genetica delle popolazioni originarie. Le specie di interesse zootecnico sono state in seguito selezionate prevalentemente per la produzione in sistemi di allevamento intensivi. Tale selezione ha portato ad una riduzione della consistenza delle razze autoctone con un elevato rischio di estinzione e conseguente perdita di variabilità genetica. E' quindi essenziale contrastare questa tendenza tutelando la diversità biologica e favorendo la conservazione di tali razze.

La diversità genetica è una risorsa fondamentale per consentire l'adattamento delle specie allevate in condizioni climatiche in rapido cambiamento, sia per la sopravvivenza delle specie all'attacco di nuovi patogeni, sia per poter indirizzare il miglioramento genetico verso nuovi obiettivi di selezione. Le razze locali, oltre a rappresentare un prezioso serbatoio di variabilità genetica, svolgono anche un ruolo ecologico sociale e culturale rilevante, per la salvaguardia del territorio, delle comunità rurali e delle loro tradizioni.

In assenza di una stima adeguata del valore della biodiversità, conservare viene ritenuto un costo per cui i vincoli economici imposti dalla scarsità delle sovvenzioni impongono scelte su cosa conservare e in che modo. Teoricamente l'approccio ideale sarebbe la conservazione della diversità genetica funzionale delle razze, cioè la variabilità dei geni che controllano caratteri degli animali espressi che sono o che potrebbero eventualmente esserlo in futuro. In realtà la conoscenza di questi geni e spesso anche dei caratteri fenotipici di molte razze considerate a rischio di estinzione è ancora molto frammentaria o insufficiente. Ancora minore se si considerano i caratteri che potranno essere utili in futuro.

Per sopperire almeno in parte a questa mancanza di informazioni, negli ultimi anni sono stati utilizzati i marcatori molecolari. Questi sono delle varianti del DNA che vengono rilevate con diverse tecnologie nei laboratori di genetica molecolare.

In sintesi si assume che razze che possiedono alleli differenti ai marcatori neutri siano anche differenti per gli alleli che controllano caratteri utili adesso o che lo saranno in un prossimo futuro. Tale assunto, seppur non vero in assoluto, è per ora la migliore approssimazione possibile in assenza di informazioni più precise sulla diversità funzionale tra le razze.

Dal 1999 la FAO ha coordinato ed implementato una strategia di salvaguardia delle risorse genetiche degli animali domestici locali attraverso una caratterizzazione sistematica a livello molecolare per ciascuna razza e attraverso l'identificazione di strategie per mantenere un'ampia variabilità genetica all'interno di ciascuna specie (Oldenbroek,1999).

La FAO (2007) e l'International Society of Animal Genetics (<http://dad.fao.org./en/refer/library/guidelin/merker/.pdf>) riconoscono quindi come una priorità universale la conservazione della biodiversità delle specie zootecniche e suggeriscono l'utilizzo di un panel di microsatelliti (Kemp *et al.*,1995; Jandurova *et al.*,2004; Kotze *et al.*,2004; Luikart *et al.*,1999), per lo studio della biodiversità e per gli studi filogenetici.

La comprensione della storia evolutiva delle specie animali di interesse zootecnico e la stima della variabilità genetica entro e tra razze rappresentano conoscenze fondamentali per un corretto processo decisionale in merito al complesso tema della conservazione.

Ad esempio, dati sulla variabilità genetica entro razza ottenuti dai marcatori molecolari possono essere usati per stimare e controllare, attraverso una corretta gestione degli accoppiamenti, il livello di consanguineità il cui aumento eccessivo minerebbe la sopravvivenza della razza stessa (Ajmone Marsan *et al.*, 2008).

Le informazioni molecolari sulla variabilità genetica tra razze permettono invece l'identificazione di razze originali con genotipi particolari che vale la pena conservare.

I marcatori molecolari genomici sono particolarmente utili per studiare la storia demografica delle popolazioni, per quantificare la quota di variabilità genetica mantenuta e distribuita tra razze, per stimare il contributo relativo di popolazioni parentali nella formazione di nuove popolazioni e per assegnare gli individui alle popolazioni di origine (Bruford *et al.*,2003). Quest'ultimo aspetto è utile per la tracciabilità e rintracciabilità dei prodotti animali lungo tutta la catena produttiva (Crepaldi *et al.*,2008). Molti studi si sono focalizzati su problematiche locali e sullo studio di poche razze in un'area geografica limitata o sul confronto di popolazioni di aree geografiche più o meno limitrofe. In generale questi studi mirano a valutare il livello di consanguineità delle razze studiate, la loro similarità con razze vicine, l'originalità di una popolazione particolare. Pariset *et al.*,(2003) hanno analizzato diversi allevamenti di pecora Sarda nel Centro Italia e rilevato in alcuni di questi la necessità di adottare piani di accoppiamento adeguati per diminuire l'elevato livello di omozigosi osservato.

Sechi *et al.*,(2007) hanno identificato capre di razza Sarda attribuibili al tipo genetico autoctono, distinguendole da capre incrociate Sarda x Maltese attraverso un'analisi integrata di dati molecolari, morfologici ed informazioni storiche sugli allevamenti.

La caratterizzazione delle razze è importante, ma è solo il primo passo verso la loro conservazione. Devono essere sviluppati modelli che analizzino congiuntamente caratteristiche genetiche e demografiche delle razze e parametri socio-economici delle zone di allevamento per aiutare il difficile processo di definizione delle priorità e delle strategie di intervento (Fadlaoui *et al.*,2006).

Deve essere svolta un'analisi accurata dei costi e degli effetti prodotti dalle differenti strategie di conservazione sulla vitalità ed evoluzione delle razze a rischio. Genetica ed economia insieme possono quindi identificare le razze da conservare con elevata priorità e le aree dove la conservazione avrà più probabilità di successo perché inserite in un sistema sostenibile, aiutando ad effettuare le scelte migliori avendo a disposizione risorse limitate.

Accanto a soluzioni “tecnologiche”, (quali la crioconservazione di gameti ed embrioni, Groeneveld *et al.*,2008) possono essere adottate facilmente allo stesso fine anche opportune strategie di gestione zootecnica e genetica della variabilità entro razza e di valorizzazione economica dell'allevamento attraverso la ottimizzazione della conduzione dell'azienda, la promozione delle produzioni tipiche e di qualità, e del ruolo ecologico, sociale e culturale dell'allevamento ovi-caprino.

1.1.3 Tracciabilità

La tracciabilità individuale mira a ricondurre un prodotto di origine animale al singolo soggetto da cui è stato ottenuto e, dal punto di vista analitico, è realizzabile con diverse tipologie di marcatori molecolari (ad es. i Microsatelliti, Ciampolini *et al.*,2006). La possibilità di implementare un sistema di tracciabilità individuale è legato alla possibilità di disporre di un campione biologico di riferimento di ogni animale allevato e la sua efficacia è limitata a prodotti ottenuti dalla lavorazione di un singolo animale.

La presenza di marcatori molecolari polimorfici presenti sul DNA è stata utilizzata per lo sviluppo di un prodotto industriale in grado di estrapolare per ciascun animale un profilo

genetico caratteristico, non soggetto a contraffazione e sempre verificabile (Dalvit,2007; Loftus,2005).

Ad avallare l'importanza della tracciabilità alimentare si aggiunge la legislazione europea che promuove ed enfatizza la capacità e la possibilità di poter reperire e verificare la corrispondenza tra marcatura dell'animale e rispettivo prodotto finito, a tutto vantaggio della sicurezza alimentare del consumatore.

L'esperienza mostra come i normali sistemi di marcatura possano venir contraffatti volontariamente o a causa di errori, per questo motivo l'utilizzo del DNA come sistema di etichettatura permette in ogni fase della filiera produttiva di verificare la corrispondenza tra animale e suoi derivati.

Nel settore ovi-caprino, dove sono numerose le produzioni tipiche e locali spesso legate a razze e popolazioni autoctone e ad una sapiente tradizione di trasformazione, lo sviluppo di sistemi di tracciabilità molecolare può assumere oggi una funzione importante nel garantire l'origine e nel promuovere le produzioni ovi-caprine nazionali e locali tipiche.

Sebbene le informazioni molecolari sulle specie ovi-caprine siano ancora limitate, il settore delle produzioni può trovare nei nuovi strumenti della genetica molecolare un valido ausilio per la valorizzazione dei prodotti tipici, rendendoli remunerativi non solo per le qualità intrinseche, ma anche per la loro specificità legata alle razze e agli ambienti di allevamento.

2. STRUMENTI DELLA GENETICA MOLECOLARE

2 Strumenti della genetica molecolare

2.1 Banca di DNA

Il primo passo per lo sfruttamento delle informazioni molecolari è la costituzione di una bio – banca, cioè di una raccolta di campioni biologici dai quali estrarre il DNA al fine di realizzare in un primo tempo le sperimentazioni necessarie per la ricerca di geni o marcatori di interesse e, eventualmente, la stima dei loro effetti e, in un secondo tempo, l'applicazione dei risultati ottenuti. Le bio-banche possono essere costituite da diverso materiale biologico (sangue, bulbi piliferi, materiale seminale, latte), ma loro peculiarità è che i campioni conservati siano collegabili ai dati anagrafici (identificazione) ed eventualmente genealogici, produttivi o clinici relativi ai soggetti prelevati. La scelta delle diverse forme di raccolta e stoccaggio del materiale biologico dipende dallo scopo della ricerca e della disponibilità economiche. In questo senso, il ricorso a materiale biologico differente dal sangue, il cui prelievo in Italia prevede sempre la presenza del veterinario, può ridurre notevolmente i costi.

Un esempio di bio-banca, il cui tessuto d'elezione per lo stoccaggio e per l'estrazione del DNA è il sangue, è rappresentato da quello delle razze bovine italiane da carne (Filippini *et al.*, 2005). In questo caso la “Banca del DNA” nasce con l'obiettivo principale di conservare i genomi dei riproduttori ed averne la disponibilità nel tempo per le indagini e le analisi utili alla selezione e alla valorizzazione delle cinque razze bovine italiane da carne Chianina, Marchigiana, Romagnola Maremmana e Podolica.

I campioni di sangue vengono conservati o su carta adsorbente, o tramite il congelamento, ma anche come DNA estratto (Banca del DNA dell'ANABIC).

Questa iniziativa rende disponibili gli strumenti per fruire delle applicazioni di genetica molecolare per i sistemi di selezione e valorizzazione delle cinque razze sopra citate. Non solo, il materiale biologico potrà essere utilizzato anche per accertare la paternità e la maternità, condizioni obbligatorie per l'iscrizione dei tori al Registro Tori del Libro Genealogico.

Altra applicazione è l'impiego per le verifiche di tracciabilità della carne a tutela dei consumatori e a garanzia della specificità della stessa commercializzata.

Si può considerare la banca del DNA delle razze bovine italiane da carne come una cassaforte dove custodire il materiale genetico di queste razze per poter studiare le anomalie genetiche che compaiono in tutte le popolazioni e poter impostare piani per la loro eradicazione. Ciò concorrerà a rendere ancora più efficiente l'allevamento dei bovini delle razze italiane da carne, in grado di supportare azioni di valorizzazione per stabilizzare gli eccellenti livelli di prezzo raggiunti e porre le basi per nuovi auspicati aumenti di produzione e di volumi di vendita.

In Italia, un altro esempio di bio-banca è la collezione di bulbi piliferi ("peloteca") della razza ovina Sarda allestita presso l'Agris Sardegna (Agenzia per la Ricerca in Agricoltura).

La costituzione della "peloteca" si è resa necessaria quando, nel 2003, l'UE ha reso obbligatoria per gli ovini allevati in Europa, la selezione per la resistenza alle Scrapie. Tale selezione, che mira all'eliminazione degli alleli che inducono la suscettibilità alla malattia e l'incremento delle frequenze alleliche di quelli che conferiscono la resistenza, presuppone la determinazione del genotipo al locus Prp dei soggetti destinati alla riproduzione. Il materiale biologico viene raccolto dall'Associazione Nazionale della Pastorizia (Asso.Na.Pa) che, tramite i tecnici delle Associazioni Provinciali Allevatori (A.P.A.), provvede al prelievo nelle

diverse greggi della Sardegna. Ciascun campione viene in seguito identificato per tipologia, data di ricevimento, stato di conservazione, codice di campionamento e codice di analisi.

La bio-banca del bulbo pilifero attualmente contiene un totale di 261794 campioni, di cui 234962 femmine e 26832 maschi.

Dal 2003 ad oggi è stata effettuata la determinazione degli alleli del gene della proteina prionica PrP ovina ai codoni 136, 154, 171 per 47671 ovini di razza Sarda.

2.2 Matrici biologiche per l'estrazione di DNA

Il materiale biologico da usare come fonte del DNA deve offrire le migliori garanzie per la conservazione e le maggiori possibilità di impiego nel tempo, non trascurando l'economicità complessiva del sistema.

Il sangue intero è in genere la principale matrice biologica fonte di DNA, ma vengono utilizzati anche bulbi piliferi, latte e materiale seminale. La scelta del tipo di matrice biologica da utilizzare dipende da:

- ✚ facilità di conservazione del campione prima della sua utilizzazione;
- ✚ facilità di estrazione del DNA;
- ✚ quantità di DNA finale;
- ✚ qualità del DNA estratto, intesa come integrità della doppia elica;
- ✚ stabilità del DNA in caso di conservazione per periodo anche lunghi.

Qualunque sia il materiale di partenza utilizzato per l'estrazione, il DNA una volta estratto va conservato in congelatore a -20°C .

2.2.1 Sangue

Il sangue intero è il tessuto che fornisce i risultati ottimali, sia per quantità che per qualità del DNA, ma è anche quello che comporta maggiori costi inerenti alla fase del prelievo.

La sua conservazione può essere fatta lasciando il campione a 4°C, per brevi periodi (3-4 giorni) o congelandolo a -20°C.

2.2.2 Bulbo

I bulbi piliferi d'altra parte presentano molti vantaggi rispetto al sangue, sia per quanto riguarda il prelievo, sia per lo stoccaggio; infatti il loro prelievo risulta essere semplice ed economico, così come la loro conservazione, che consente estrazioni ripetute nel tempo, senza correre il rischio di perdere il campione in seguito allo scongelamento e al ricongelamento dello stesso.

Il DNA ottenibile risulta però più scarso in qualità e quantità (Lasagna *et al.*,2005).

2.2.3 Latte

2.2.3.1 *Cenni sulla composizione del latte:*

E' il secreto della ghiandola mammaria delle femmine di animale in buono stato di salute e nutrizione, ottenuto dalla mungitura regolare, completa ed ininterrotta della mammella,

escludendo la secrezione entro i dieci giorni dopo il parto. Si presenta come un liquido di colore bianco opaco, con tendenza al giallognolo quando il contenuto di grasso è elevato.

La sua composizione varia ed è influenzata dalla specie, dalla razza, dall'età dell'animale, dal tipo di alimentazione, dalla stagione e dalle condizioni ambientali.

Il latte è un sistema eterogeneo, costituito da globuli di materia grassa sospesi in una soluzione insieme al lattosio, proteine (per la maggior parte caseina), sali di calcio, fosforo, cloro, sodio, potassio e zolfo, contiene invece poco ferro; fornisce vitamine A, B1, B2, C, D, mentre l'acqua costituisce dall'80% al 90% del volume del latte intero. Le sostanze grasse si trovano emulsionate sotto forma di goccioline liquide, quelle proteiche assieme ai costituenti minerali invece sotto forma di dispersione colloidale, mentre il lattosio, le sostanze non proteiche, i sali minerali cristalloidi in forma di soluzione.

Il grasso è il costituente che presenta la massima variazione; tale variazione è influenzata dalla razza, dallo stadio di lattazione e dal regime alimentare. Il grasso del latte si trova sottoforma di emulsione ed è costituito da globuli sferici di diametro variabile in funzione dell'associazione tra i gliceridi (parte interna del globulo) e le sostanze della membrana, rappresentate da proteine, fosfolipidi e colesterolo (parte interna). Tra la parte interna e quella esterna, il globulo del grasso presenta una zona detta intermedia costituita da lipidi con un più alto punto di fusione e quindi più "densi" rispetto ai precedenti, sopra menzionati. I componenti di gran lunga più rappresentati, nel grasso, sono i trigliceridi, che ne determinano le proprietà fisiche e permettono il discioglimento di altri lipidi e sostanze liposolubili. Oltre ai trigliceridi, fosfolipidi e steroli sono le altre due classi di lipidi presenti nel latte. Degli steroli il più rappresentato è il colesterolo.

Il maggior costituente solubile del latte è il lattosio, un disaccaride presente in due forme isomere in equilibrio tra loro la cui concentrazione è compresa tra 4,5 e 5g/ml.

Le proteine presenti sono classificabili in tre gruppi principali: le caseine, le siero proteine e le proteine di derivazione caseinica per proteolisi post-secretoria.

Il pH del latte allo stato fresco manifesta una debolissima acidità reale che varia tra 6,5 e 6,8; questa debole acidità è dovuta principalmente alla caseina, ai fosfati, all'anidride carbonica ed ai citrati. Valori elevati di pH possono essere indicatori di una patologia in atto.

2.2.3.2 *Cellule somatiche*

L'esame al microscopio ottico del latte permette di identificare elementi cellulari, differenti per morfologia, funzione e derivazione: cellule di derivazione ematica e cellule epiteliali, proprie della mammella, con funzione di rivestimento e secrezione (Morgante *et al.*,1994; Calderini *et al.*,1992; Perrin e Baudry,1993; Tripaldi,1990).

Le cellule somatiche propriamente dette sono i leucociti o globuli bianchi che provengono dal circolo sanguigno (Paape, *et.al.*,2007). Sono normalmente presenti in concentrazioni inferiori alle 200.000 unità/ml nel latte di animali sani. I leucociti includono macrofagi, linfociti e neutrofili polimorfonucleati. I macrofagi sono il tipo cellulare predominante nel latte di mammelle sane, aumentano naturalmente verso la fine della lattazione e in prossimità dell'asciutta (Morgante *et al.*,1994). I linfociti sono deputati al coordinamento delle attività delle altre cellule coinvolte nel sistema immunitario di difesa. La presenza degli eritrociti è rara ed è un reperto che assume importanza se correlato ad alterazioni patologiche.

Si trovano poi altre forme cellulari di varia natura, tra cui le cellule giganti di Langherans e frammenti cellulari, difficili da differenziare per la rottura del nucleo, del citoplasma o addirittura di entrambi.

2.2.3.2.1 *Variazioni del Contenuto in Cellule Somatiche (CCS).*

Nel corso degli anni diversi Autori hanno dedicato le loro ricerche allo studio delle variazioni quantitative di questo parametro, allo scopo di stabilire una soglia che potesse essere assunta quale livello di guardia nella definizione dello stato sanitario della mammella.

Nel 1960, Okada stabiliva che il CCS nel latte ovino doveva aggirarsi tra le 100.000 ± 30.000 cellule/ml.

Nel 1974 Ledda e Arrizza consideravano normale un contenuto in cellule pari a 500.000 cellule/ml nel latte individuale di ovini, ottenuto attraverso mungitura meccanica.

Nel 1983 fu proposto da Fruganti un livello “soglia”, quale parametro del contenuto in cellule somatiche da adottare anche per la specie ovina, sugli stessi valori utilizzati per latte vaccino; così, è stato considerato “normale” il secreto contenente un tenore in cellule <500.000 cellule/ml ed un contenuto in neutrofili pari al 12%; ”dubbio”, il latte che aveva lo stesso contenuto in cellule ma presentava una percentuale in neutrofili compresa tra il 12 e 20%. Le differenze di opinioni tra i diversi Autori citati riguardo al valore fisiologico ed a quello soglia del contenuto in cellule somatiche nel latte ovino, sono imputabili principalmente, alle differenti condizioni sperimentali condotte lungo il corso degli anni: diverse sono infatti le variabili che possono influire sull’ottenimento di risultati, quali tecniche di prelievo, esecuzione dell’esame batteriologico, tecnica analitica utilizzata per la determinazione del contenuto del CCS del latte, acquisizione rigorosa e puntuale dei dati nel corso della lattazione oggetto di studio, corretta individuazione dei campioni se riferiti ad emimammelle oppure se corrispondenti a campioni di latte massale (Rosati *et al.*,2005).

Una significativa variabilità può essere registrata in relazione alle tecniche di mungitura adottate. Infatti sono comparabili i valori di CCS ottenuti in ovini sottoposti a mungitura

meccanica e quelli sottoposti a mungitura manuale (Bergonier *et al.*,1996a) ma rivestono fondamentale importanza le modalità di esecuzione della stessa (Manfredini *et al.*,1993; Muelas *et al.*,1996). Anche l'alimentazione, ma soprattutto i bruschi cambiamenti della razione, dovuti a fattori stagionali e climatici (Manfredini *et al.*,1993), hanno delle ripercussioni indirette sul contenuto in cellule somatiche del latte (Cosseddu, 1984).

2.2.3.3 Il latte come matrice biologica per l'estrazione del DNA

L'utilizzazione del latte, quale matrice biologica alternativa per l'ottenimento del DNA da sottoporre ad analisi molecolari, offre il vantaggio di comportare l'impiego di personale non specializzato per la sua raccolta e la semplice spedizione ai laboratori di analisi (Aleandri e Di Gregorio, 1994; Lipkin *et al.*, 1993,1998; Lindquist *et al.*,1994; Amills *et al.*,1997; Murphy *et al.*,2002; Ernst e Dentine, 1992; D'Angelo *et al.*,2007).

La possibilità di utilizzare i leucociti delle cellule somatiche del latte come fonte di DNA presenta indubbi vantaggi, soprattutto se l'analisi deve essere eseguita su un elevato numero di individui distribuiti in numerosi allevamenti; questo comporterebbe non solo un ridotto dispendio economico, ma anche una pratica che non modificherebbe la gestione e le abitudini aziendali d'allevamento.

2.3 Metodiche di estrazione del DNA

2.3.1 Generalità:

L'ottimizzazione dell'estrazione dipende:

- ✚ dalla fonte utilizzata per l'estrazione (tessuti animali o vegetali, cellule eucariotiche o procariotiche);
- ✚ dal materiale biologico contenente la fonte degli acidi nucleici usato per l'estrazione (organo intero, sangue, siero, plasma, bulbo pilifero, materiale seminale, etc.);
- ✚ dall'applicazione prevista post-estrazione (PCR, clonaggio, restrizione enzimatica, Southern blotting, etc.).

Indipendentemente dalla tecnica di estrazione usata, essa deve rispondere a due requisiti principali: la resa e la purezza, intese sia come presenza in soluzione dell'acido nucleico in esame, sia come assenza di sostanze contaminanti che, legandosi ai reagenti in soluzione, potrebbero modificare l'esito delle analisi seguenti.

Dopo aver scelto la matrice biologica da cui estrarre il materiale genetico, il percorso di estrazione e purificazione prevede quattro fasi:

1. Lisi delle cellule
2. Inattivazione delle nucleasi cellulari
3. Separazione e recupero dell'acido nucleico
4. Precipitazione
5. Risospensione

2.3.1.1 Lisi cellulare.

La dissoluzione della cellula, distruzione della membrana, è una fase delicata e spesso la sua procedura è un compromesso: essa deve essere abbastanza aggressiva da frammentare il complesso materiale di partenza, ma gentile abbastanza da preservare l'integrità dell'acido nucleico.

Le comuni tecniche di lisi includono:

- ✚ distruzione meccanica: es. lisi ipotonica
- ✚ trattamenti chimici: es. lisi con detergenti o sostanze caotropiche
- ✚ digestione enzimatica: es. proteinasi k

Tra i detergenti viene impiegato principalmente l'SDS (Sodio Dodecil Solfato), un detergente anionico, la cui funzione è quella di solubilizzare i lipidi delle membrane e legare le proteine alterandone la struttura secondaria. L'aggiunta dell'SDS nella fase di incubazione permette inoltre la denaturazione termica e la lisi delle proteine rimanenti, la rottura delle cellule, la solubilizzazione di eventuali fosfolipidi/trigliceridi ancora presenti e delle pareti cellulari.

Il PBS (Phosphate Buffered Saline) è la soluzione tampone comunemente utilizzata. E' una soluzione salina che contiene cloruro di sodio, sodio fosfato e potassio fosfato. Il tampone aiuta a mantenere costante il pH. Il PBS è isotonico, non tossico e nell'estrazione funge come soluzione di lavaggio per le cellule.

Gli agenti caotropici in soluzione acquosa perturbano la regolare struttura dei legami idrogeno, destabilizzano le membrane e favoriscono il rilascio dei componenti cellulari.

Tutti questi detergenti assieme ad un'accurata centrifugazione permettono di non dover utilizzare composti tossici.

2.3.1.2 Inattivazione delle nucleasi cellulari

La proteinasi K è un' endopeptidasi di origine fungina. Appartiene alla famiglia delle serina-proteasi e taglia con bassa specificità sul legame adiacente ad un residuo alifatico o aromatico. Viene comunemente utilizzata per la digestione di tessuti aspecifici. Agisce solo ad elevate temperature (55°C) e degrada le proteine che contaminano gli acidi nucleici e che potrebbero in qualche modo disturbare l'amplificazione del DNA ottenuto. E' attiva su un ampio range di pH (4-12,5).

Lisi cellulare e inattivazione delle nucleasi possono essere combinate, infatti una soluzione può contenere detergenti per solubilizzare le membrane e sali caotropici per inattivare gli enzimi intracellulari.

2.3.1.3 Separazione e il recupero dell'acido nucleico

Per la separazione e il recupero dell'acido nucleico dalla soluzione contenente il lisato cellulare il metodo classico applicato è l'utilizzo di solventi organici, come il fenolo o il cloroformio, che consentono la separazione degli acidi nucleici dai contaminanti di natura proteica successivamente, dopo la centrifugazione, gli acidi nucleici vengono recuperati in soluzione acquosa .

Un'altra metodologia usata per questo passaggio prevede l'adsorbimento del DNA sulla superficie di una matrice di gel di silice in presenza di sali caotropici.

2.3.1.4 *Precipitazione*

La precipitazione avviene di solito in alcool etilico o isopropanolo

2.3.1.5 *Risospensione*

Il DNA precipitato viene in genere risospeso in H₂O o in una soluzione contenente Tris -HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8 in acqua distillata (TE 1X). Dopo la risospensione si può procedere alla rispettiva quali-quantificazione e conservazione.

2.3.2 Metodologie classiche per l'estrazione del DNA

Diverse metodologie sono state proposte per l'estrazione del DNA da vari tessuti o campioni biologici. Tra queste possiamo ricordare:

- ✚ estrazione rapida (Rudbeck and Dissing,1998);
- ✚ estrazione con fenolo, la cui resa finale risulta essere piuttosto elevata, se rapportata al materiale di partenza con una taglia del DNA di circa 100 – 150 kb (Blin e Stafford, 1976);
- ✚ l'impiego di formammide, che consente di ottenere basse concentrazioni di DNA (circa 10ng/μl ma di taglia superiore alle 150 kb, Kupiec *et al.*,1987);
- ✚ l'utilizzo di guanidina HCl che prevede una taglia del DNA estratto non superiore alle 80 kb (Bowtell *et al.*,1987).

Altre metodiche, meno tossiche per l'operatore, più veloci e meno costose utilizzano il metodo salino e si differenziano sostanzialmente per l'utilizzo o meno della proteinasi k (Lipkin *et al.*,1993,1998; Lindquist *et al.*,1994; Amills *et al.*,1997; Murphy *et al.*,2002; Ernst e Dentine,1992; D'Angelo *et al.*,2007).

Sono anche disponibili in commercio numerosi kit (Es. FlexiGene DNA Kit (Qiagen), Puregene DNA Kit (Gentra), NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) che consentono di semplificare le operazioni di estrazione, ma sono generalmente abbastanza costosi.

2.4 Quantificazione del DNA

Il DNA estratto può essere quantificato nei seguenti modi:

2.4.1 Valutazione della concentrazione di DNA attraverso metodo elettroforetico su gel d'agarosio

Per valutare la concentrazione di DNA si può ricorrere, soprattutto nei casi in cui non si disponga di elevate quantità di DNA, alla quantificazione diretta da gel d'agarosio, su cui sia stato caricato oltre al campione a concentrazione ignota, anche del DNA di riferimento presente in quantità nota.

L'elettroforesi viene effettuata su gel di agarosio preparato allo 0.8% che ha una capacità di separare frammenti compresi tra 0.4Kb e 50Kb. I frammenti si separano per dimensione, essendo ricoperti di cariche (date dai fosfati ionizzati) e disposti in un campo elettrico che li fa migrare attraverso le maglie del gel.

Le dimensioni dei frammenti del DNA vengono quindi identificate mediante il confronto con la migrazione sul gel dei pesi molecolari standard.

Per la colorazione dei campioni e la successiva visualizzazione delle bande, dopo la corsa a 80 V per 20', il gel viene immerso in una soluzione contenente un intercalante fluorescente (Bromuro di Etidio o il Syber-Safe) e visualizzato attraverso una lampada UV.

La valutazione finale del DNA è però approssimativa ed è per questo motivo che si ricorre ad una sua quantificazione utilizzando la spettrofotometria.

2.4.2 La tecnica spettrofotometrica

La spettrofotometria è una tecnica analitica, qualitativa e quantitativa che, avvalendosi dell'uso dello spettrofotometro, permette il riconoscimento e la quantizzazione di una sostanza, in base al suo spettro di assorbimento della luce. La lunghezza d'onda usata dallo spettrofotometro per la misura della quantità di DNA è di 260 nm e la misura è espressa dalla Densità Ottica (OD). Una densità ottica pari ad 1 corrisponde approssimativamente a 50 µg/ml di DNA a doppio filamento. Infine il rapporto tra le letture a 260 nm e 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) dà una stima della purezza degli acidi nucleici.

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

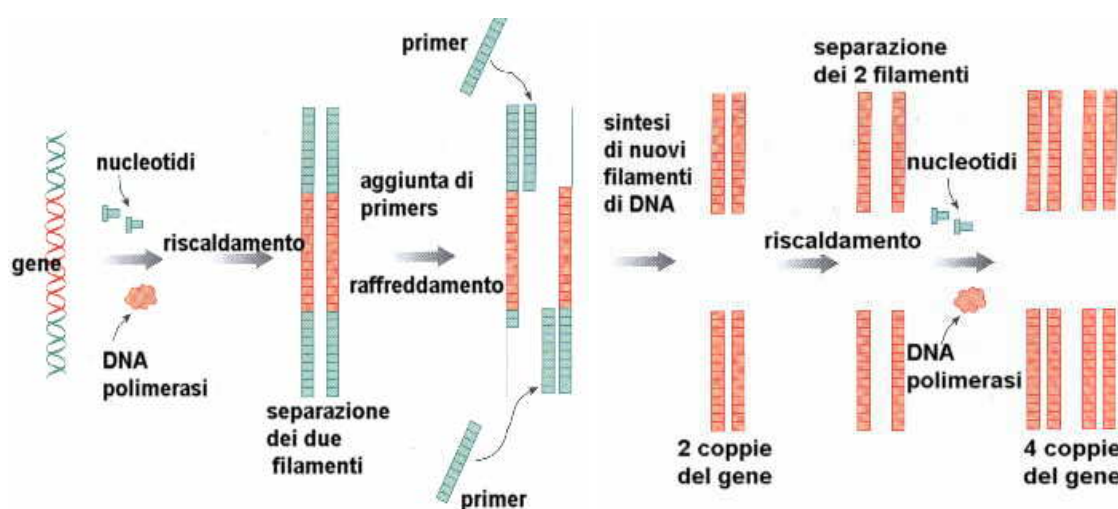
La reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) è una tecnica per produrre velocemente molte copie di frammenti di DNA (Saiki *et al.*,1985,1988; Mullis, 1990). Per amplificare una porzione di DNA bersaglio sono sufficienti circa 50 ng di acido nucleico. Il meccanismo della PCR si basa sulla capacità dell'enzima DNA polimerasi di sintetizzare il filamento di DNA complementare a quello bersaglio durante una reazione 'in vitro' utilizzando un mix dei 4 nucleotidi che costituiscono il DNA (A=Adenina, T=Timina, G= Guanina, C=Citosina).

La reazione di PCR avviene in un'unica provetta contenente tutti i componenti necessari per la duplicazione del DNA: il DNA da amplificare, un mix dei 4 nucleotidi, un mix di due oligonucleotidi (circa 20 basi) chiamati primer e che hanno la sequenza complementare in direzione 5'-3' all'area adiacente alla sequenza bersaglio da amplificare, l'enzima polimerasi che nelle reazioni di PCR è la 'Taq' polimerasi (dalle iniziali del batterio resistente alle alte temperature da cui l'enzima è stato isolato *Thermus aquaticus*, Saiki *et al.*,1988).

La reazione di PCR si basa su 3 step fondamentali (Figura 2.1):

- 1) la miscela di reagenti viene portata ad un'elevata temperatura (95°C) per denaturare (separare) i due filamenti complementari del DNA;
- 2) viene abbassata la temperatura (range 50-62 C°, dipende dalla composizione in basi degli oligonucleotidi) per permettere ai primer di appaiarsi (annealing) alle sequenze complementari;
- 3) si risollewa la temperatura a 72 C° per permettere alla Taq polimerasi di polimerizzare i nuovi filamenti di DNA estendo i primer utilizzando come fonte la miscela dei 4 nucleotidi;

Cicli ripetuti di questi 3 step (separazione dei frammenti, annealing dei primer e sintesi dei nuovi filamenti) permettono di produrre numerose copie del frammento di DNA bersaglio in poco tempo e nella stessa provetta di PCR. Ripetendo il ciclo per almeno 30 volte si ottengono circa un milione di copie del DNA bersaglio in circa 3 ore. L'intero processo è automatizzato e avviene su un macchinario chiamato termociclatore che è programmato per cambiare la temperatura della reazione in poco tempo durante ogni ciclo per permettere la denaturazione e la sintesi del DNA.



Fonte: www.racine.ra.it/biotecnologie/img/pcr1.jpg

Figura 2.1 Schema della PCR (Polymerase Chain Reaction)

2.6 I marcatori molecolari

Esistono differenti tipi di marcatori molecolari: marcatori biochimici come i gruppi sanguigni e gli allozimi e marcatori genetici come gli RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos *et al.*, 1995), i

microsatelliti e gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism, Syvanen,2001; Vignal *et al.*,2002).

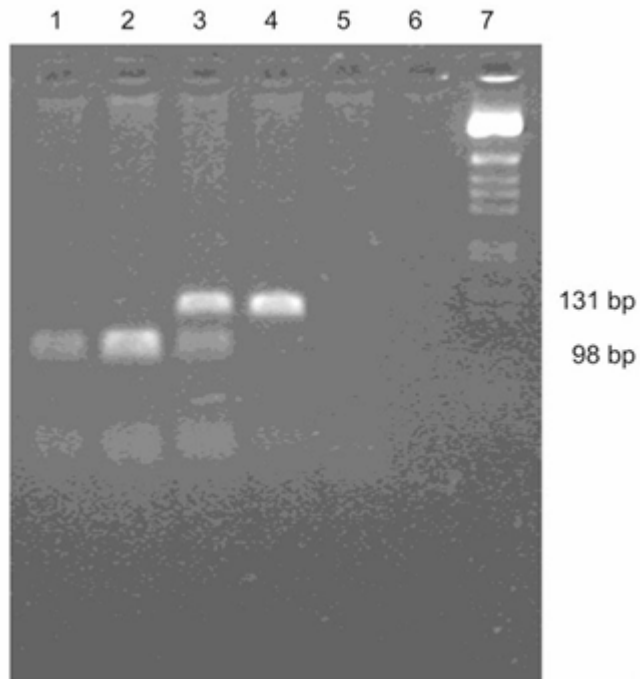
I marcatori biochimici mettono in evidenza differenze nelle molecole proteiche e, quindi, il polimorfismo esistente nei geni che codificano per tali proteine; da questo punto di vista, essi sono degli indicatori indiretti delle differenze alleliche. Tuttavia le differenze negli amminoacidi che costituiscono la proteina non sempre possono essere messe in evidenza durante l'analisi: in questo modo, perciò, si perde una parte di informazioni sulla diversità genetica.

Inoltre i geni sono molto meno polimorfici rispetto a marcatori genetici: questo avviene perchè una mutazione in un gene sarebbe certo più deleteria e quindi la variabilità tende ad essere più alta nelle parti del DNA non codificante; infatti la parte del genoma codificante risulta più conservata proprio per evitare che una mutazione, per la maggior parte delle volte nociva, possa causare errori nella fase di trascrizione e traduzione con una conseguente perdita di funzionalità della proteina codificata.

2.6.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Gli RFLP furono i primi marcatori molecolari ad essere studiati: polimorfismi identificati in base alla presenza o meno nel DNA genomico di siti di restrizione. Recentemente si utilizza un'evoluzione di questa tecnica: la PCR-RFLP. La regione di interesse del genoma viene amplificata tramite PCR e i prodotti ottenuti trattati con un enzima di restrizione in grado di riconoscere una sequenza specifica. In base alla presenza o meno di questa sequenza l'enzima

può tagliare il frammento di PCR. Mediante elettroforesi si è in grado di determinare se il frammento amplificato è stato tagliato o meno: cioè se la sequenza specifica riconosciuta dall'enzima è presente inalterata oppure no (Figura 2.2).



Fonte: www.biomedcentral.com//1471-2407-8-50-2-l.jpg

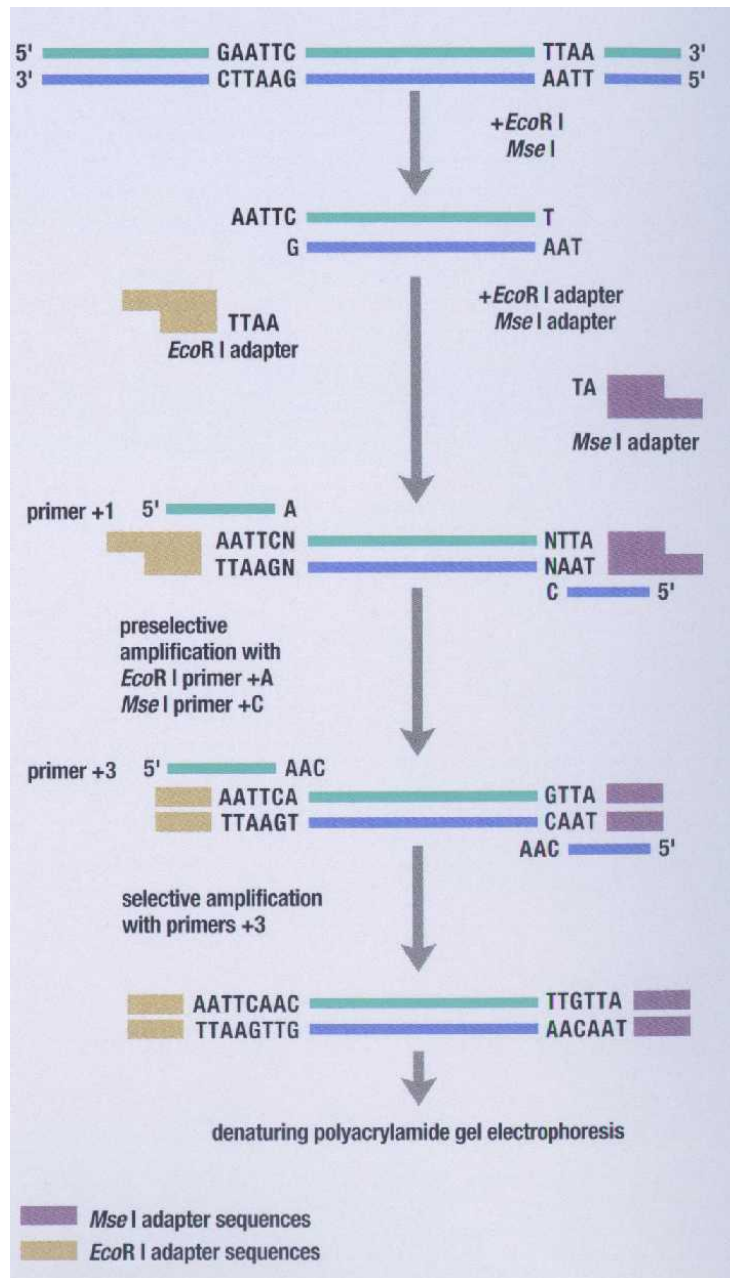
Figura 2.2 Esempio di gel PCR-RFLP: nella colonna 1-2 le bande non sono state tagliate e migrano in corrispondenza del marker-DNA pari a 98bp, perciò si parla di omozigosi, nella colonna 3 la banda viene tagliata e le rispettive migrazioni si trovano in corrispondenza del marker-DNA pari a 131bp e 98bp e quindi di eterozigosi, in corrispondenza della colonna 4 un altro caso di omozigosi con la migrazione della banda in corrispondenza del marker-DNA pari a 131bp, infine nella colonna 7 il marker-DNA marker di taglia nota.

Pur essendo marcatori codominanti, (Figura 2.2) lo svantaggio principale è dato dalla loro bassa informatività, infatti i polimorfismi identificati con la tecnica PCR-RFLP presentano solo due alleli possibili: il sito di restrizione intatto o meno.

2.6.2 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

La tecnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) è stata messa a punto da Vos nel 1995 ed è basata sulla combinazioni di due diverse fasi: la digestione del DNA, con una coppia di enzimi di restrizione, e l'amplificazione selettiva dei frammenti 'ristretti' mediante l'ausilio di primer specifici complementari alle sequenze di taglio (**Figura 2.3**).

La tecnica AFLP presenta numerosi vantaggi come quello di essere universalmente applicabile a tutti gli organismi viventi e quello di permettere l'analisi contemporanea di un elevato numero di loci genetici (Ajmone-Marsan *et al.*,2002; Negrini *et al.*,2006; De Marchi *et al.*,2006). Lo svantaggio maggiore è che anche in questo caso si possono mettere in evidenza solo due alleli, inoltre gli AFLP sono marcatori dominanti e quindi non è possibile distinguere l'eterozigote dall'omozigote.



Fonte: <https://mmg/835/snapshot.afs/DNAmarkers>

Figura 2.3 Schema della tecnica degli AFLP.

2.6.3 *Short Tandem Repeat (STR o Microsatelliti)*

I microsatelliti (STR, Short Tandem Repeat) sono tratti di DNA costituiti da unità di-, tri-, tetra-nucleotidiche ripetute più volte, il numero di tali ripetizioni rappresenta gli alleli del marcatore (Figura 2.4) Il numero di ripetizioni (alleli) varia frequentemente portando ad un alto grado di polimorfismo.

Nel genoma dei mammiferi sono numerosi, con una densità media stimata intorno a 1 STR ogni 30,000- 10,000 bp.

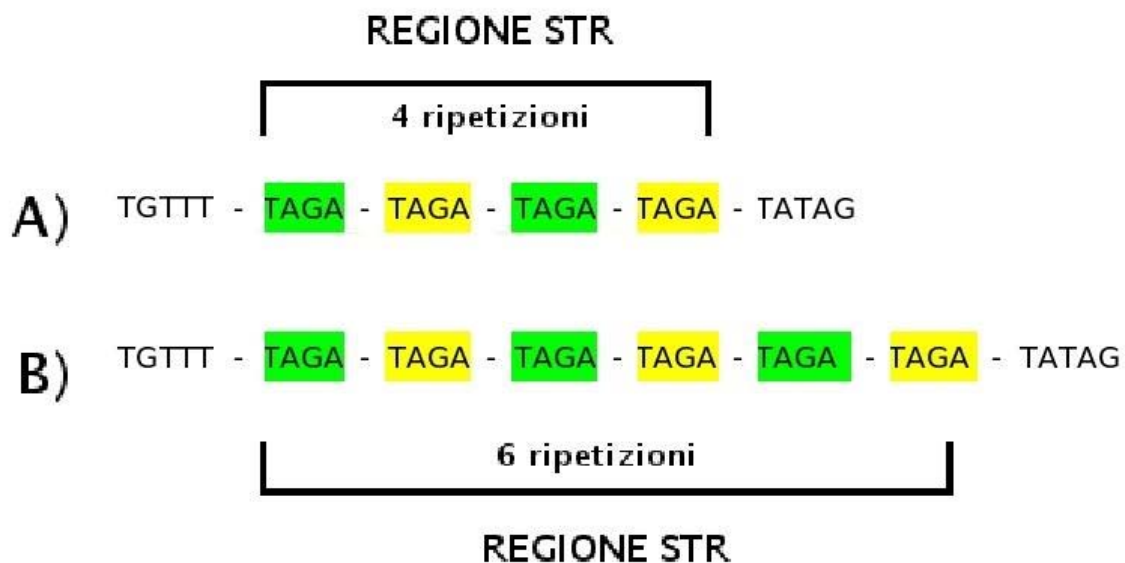


Figura 2.4 Polimorfismo di un microsatellite: n.4 ripetizioni tetra nucleotidiche (A) e n.6 ripetizioni tetra nucleotidiche (B).

I microsatelliti sono molto utilizzati in virtù della loro alta variabilità e dell'elevato grado di polimorfismo sicuramente maggiore rispetto a quello dei marcatori tradizionali. Inoltre, poiché in genere non si trovano in zone del DNA codificante, non sono sottoposti a selezione

e quindi forniscono informazioni più sicure riguardo all'evoluzione delle popolazioni in esame. Il vantaggio maggiore di questo tipo di marcatori molecolari è che essi sono codominanti: è possibile distinguere l'individuo omozigote da quello eterozigote. Essi inoltre sono facilmente analizzabili con una semplice PCR e successiva analisi elettroforetica. Questa relativa facilità di analisi ha portato ad un rapido incremento del numero degli STRs esaminati. Lo sviluppo della tecnologia dei sequenziatori automatici per la loro analisi ha contribuito a fare dei microsatelliti i marcatori più utilizzati per svariate applicazioni: la costruzione delle mappe genetiche (Beja-Pereire *et al.*,2003; Ibeagha-Awemu *et al.*,2004; Joshi *et al.*,2004; Sodhi *et al.*,2005; Tapio *et al.*,2005), lo studio della filogenesi (ECONOGENE <http://www.econogene.eu/>; Peter *et al.*,2006; Canòn *et al.*,2006; Cappuccio *et al.*,2006; European Cattle Genetic Diversity Consortium, 2006; Pariset *et al.*,2006a; Pariset *et al.*,2006b; Peter *et al.*,2006; SanCristobal *et al.*,2006,a,b) e delle differenze tra specie e razze (Usai *et al.*,2006b); l'analisi dei geni che controllano le caratteristiche morfologiche e produttive degli animali (Heyen *et al.*,1999; Schrooten *et al.*,2000; Malek *et al.*,2001; Nezer *et al.*,2002; Carta *et al.*,2003; Barillet *et al.*,2005), l'analisi di parentela (Binns *et al.*,1995; Usha *et al.*,1995; Bowling *et al.*,1997; Luikart *et al.*,1999; Tozaki. *et al.*,2001; Cho *et al.* 2003, 2004; Lee *et al.*,2006) e della tracciabilità (Ciampolini *et al.*,2006).

Come precedentemente accennato attualmente, per le principali specie di interesse zootecniche, per la diagnosi di parentela ci si basa prevalentemente sull'analisi del DNA utilizzando i marcatori microsatelliti (Binns *et al.*,1995; Usha *et al.*,1995; Bowling *et al.* 1997; Luikart *et al.*,1999; Tozaki *et al.*,2001; Cho *et al.*,2003, 2004; Lee *et al.*,2006).

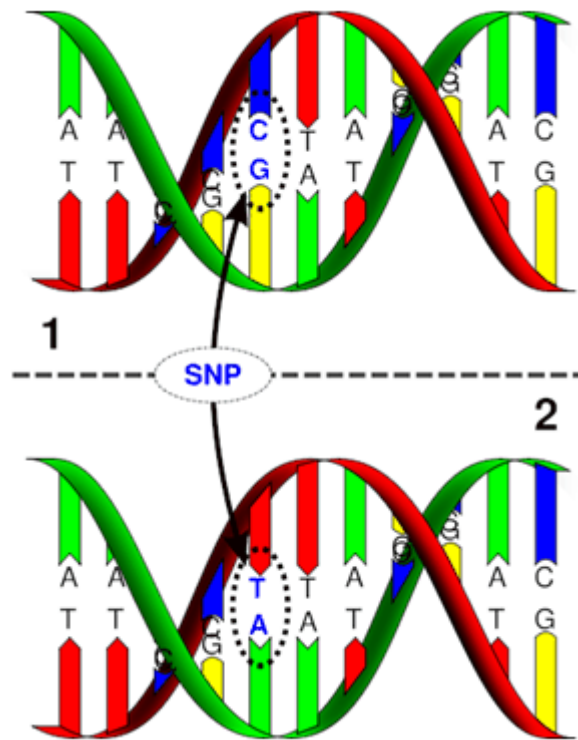
In genere per queste diagnosi si usa un set di microsatelliti organizzati in multiplex (più marcatori analizzati contemporaneamente) e analizzabili tramite corsa elettroforetica su sequenziatore automatico. La disponibilità di un set marcatori polimorfici, quindi con un

elevato potere discriminante, consente di raggiungere elevate probabilità di esclusione di paternità.

L'analisi dei microsatelliti può anche essere utilizzata per l'identificazione degli animali. Questa si basa sulla probabilità che due animali, non gemelli identici, scelti a caso nella popolazione possano presentare lo stesso genotipo per tutti i marcatori microsatelliti che costituiscono un particolare set o pannello utilizzato per l'analisi. Più marcatori sono utilizzati e maggiore è l'eterozigosità di questi nella popolazione oggetto di studio, minore è la probabilità che due animali presi a caso presentino lo stesso profilo per i loci analizzati.

2.6.4 *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*

Gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism Syvänen, 2001) sono i marcatori più diffusi nel genoma animale (uno ogni 500-1000 nucleotidi). Identificano polimorfismi di singoli nucleotidi sia nelle regioni non codificanti che in quelle codificanti del DNA (Dwight *et al.*, 2000). Sono marcatori biallelici codominanti (Figura 2.5).



Fonte: science.marshall.edu//416px-Dna-SNP_svg.png

Figura 2.5 Esempio di una sostituzione nucleotidica (SNP)

Le tecniche di genotipizzazione di questi marcatori fino ad ora sviluppate sono essenzialmente basate su un passaggio iniziale di PCR del frammento di DNA che contiene il polimorfismo e di un successivo sequenziamento. Sono inoltre state sviluppate recentemente diverse piattaforme e tecnologie (Vignal *et al.*,2002). In realtà oggi gli SNPs sono studiati principalmente attraverso i microarrays, che permettono l'analisi simultanea di migliaia di SNPs ed una veloce tipizzazione elaborata da un computer.

La possibilità di individuare SNP all'interno delle regioni codificanti in geni candidati per essere selezionati in modo differenziale nelle diverse razze è di particolare importanza, poiché potrebbe facilitare l'identificazione di marcatori specifici per razza.

In conclusione si può affermare che i vari marcatori molecolari utilizzati nelle specie zootecniche hanno già portato molte utili applicazioni nel miglioramento genetico degli animali: migliore conoscenza dei geni e loro meccanismi di regolazione; individuazione di QTL; diagnosi e selezione contro le malattie (Scrapie); identificazione degli animali e determinazione delle relazioni di parentela.

Queste prime applicazioni lasciano appena intravedere tutto il potenziale innovativo della genetica molecolare per il miglioramento e la salvaguardia delle produzioni zootecniche (Russo, 2001).

3. Cenni sulla Selezione in Italia

3 Cenni sulla Selezione in Italia

La teoria della selezione trova diretta applicazione per diversi indirizzi produttivi nelle numerose razze domestiche italiane. Uno sviluppo favorevole si è avuto nelle razze bovine da latte grazie alla chiarezza dell'obiettivo di selezione, alla facilità di misurazione del carattere (quantità e qualità di latte prodotto) ed all'uso dell'inseminazione artificiale, che rappresenta oltre il 90% delle fecondazioni; questa tecnologia è fondamentale per un'efficiente applicazione dei programmi di selezione.

L'esperienza acquisita nelle metodiche di selezione nei bovini da latte, per la quantità e la qualità del latte, è stata estesa anche ad altri caratteri produttivi ed ad altre specie zootecniche.

3.1 Schemi di selezione dei piccoli ruminanti

Il miglioramento genetico delle razze ovine e caprine in Italia è affidato alla Associazione Nazionale della Pastorizia, la quale è incaricata dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali della tenuta dei Libri Genealogici e dei Registri Anagrafici.

L'applicazione di schemi di selezione nei piccoli ruminanti da latte è limitata dall'elevato costo dei controlli funzionali, ciò ha influito negativamente sulla dimensione delle popolazioni in selezione, che di fatto rappresentano quote marginali (tra il 3 e il 10%) delle popolazioni commerciali.

Inoltre, la scarsa diffusione dell'inseminazione strumentale negli ovini e della riproduzione naturale organizzata in gruppi di monta rendono molto difficoltosa la realizzazione di valutazioni genetiche accurate anche nelle popolazioni controllate. In generale, il miglioramento genetico delle razze ovine e caprine italiane mostra preoccupanti difficoltà organizzative, che rendono in molti casi non completamente utilizzati i dati dei controlli funzionali. In questo contesto, anche in considerazione del recente interesse per nuovi obiettivi di selezione legati al valore nutrizionale ed alla sicurezza alimentare delle produzioni, nonché alla riduzione dei costi di produzione e alla resistenza alle malattie, è in atto una approfondita discussione sulle modalità di adeguamento degli schemi di selezione anche in considerazione delle nuove tecnologie fornite dalla genetica molecolare.

Da questo punto di vista, gli ottimi risultati ottenuti per la selezione per la resistenza alla Scrapie operata da Asso.Na.Pa. nei Libri Genealogici delle principali razze ovine costituiscono un importante punto di partenza.

Esistono pur tuttavia numerose popolazioni ovine e caprine non ancora dotate di Registro Anagrafico, né tanto meno di Libro Genealogico.

I paragrafi che seguono descrivono brevemente la gestione delle popolazioni ovine e caprine in Sardegna.

3.1.1 Schema di selezione razza ovina Sarda:

Lo schema di selezione della razza ovina Sarda, così come quello della maggior parte delle razze ovine da latte europee, si fonda sul principio della gestione piramidale della

popolazione (Figura 3.1) con all'apice della piramide il Libro Genealogico (LG), dove si applicano i controlli funzionali delle produzioni, la valutazione genetica dei riproduttori, la fecondazione artificiale (FA) e la monta naturale (MN) controllata, e alla base della piramide il resto della popolazione, cosiddetta commerciale, che si approvvigiona di arieti dal LG (Barillet,1997; Carta and Ugarte,2003).

L'obiettivo di selezione è quello dell'incremento della quantità di latte per capo e per lattazione. Nell'ultimo ventennio l'organizzazione dello schema di selezione della razza Sarda ha subito notevoli evoluzioni. (Salaris *et al.*,2008): il numero di capi e di allevamenti partecipanti all'attività di selezione è cresciuto regolarmente, seppure in modo meno marcato di quanto avvenuto negli ultimissimi anni sino a toccare la quota di circa 240,000 capi, in oltre un migliaio di allevamenti. Rispetto alla popolazione commerciale, stimabile in circa 3,600,000 capi e 13,000 allevamenti, la dimensione del LG è inferiore a quella ritenuta ottimale per garantire che il progresso genetico realizzato sia, seppure con un certo ritardo temporale, trasferito alla totalità della popolazione commerciale.

Uno dei fattori che limitano la taglia effettiva della popolazione effettiva sottoposta a selezione è sicuramente l'elevato numero di soggetti di ascendenza ignota. Salaris *et al.*,(2008) infatti stimano che il 30% delle agnelle da rimonta degli allevamenti iscritti al LG della razza abbia genealogia sconosciuta, mentre nel 30% degli allevamenti iscritti tutta la nuova generazione non presenta informazioni genealogiche. Tale carenza nella registrazione delle informazioni genealogiche è in gran parte dovuta alle difficoltà insite nella gestione dei gruppi di monta.

Alla base di tutti gli schemi di selezione per un carattere come la produzione di latte che si esprime su un solo sesso, vi è la distinzione tra giovani maschi in prova e maschi miglioratori. I giovani arieti vengono ammessi alla riproduzione nel LG, sia in FA che in

MN, solo se hanno una valutazione genetica basata sulle informazioni di pedigree (media del valore genetico dei genitori) che superi una certa soglia.

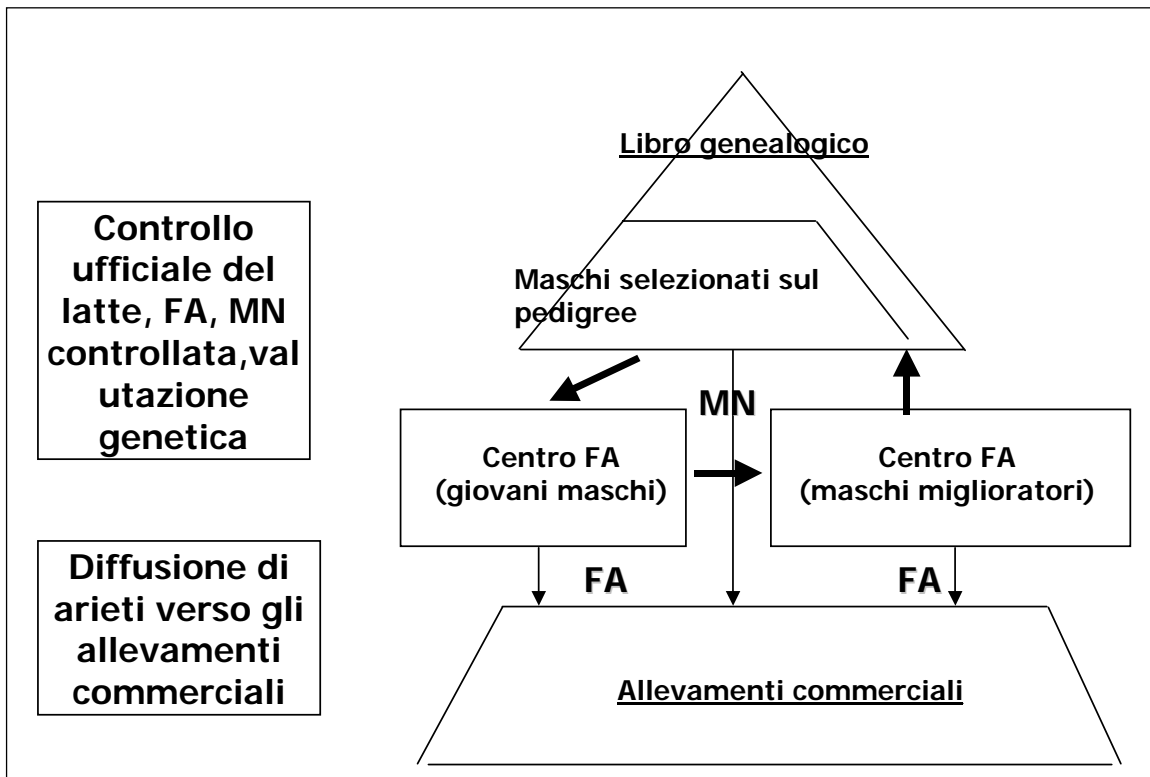


Figura 3.1 Diagramma degli schemi di selezione negli ovini da latte.

Essi potranno continuare a essere utilizzati come riproduttori e soprattutto potranno divenire padri di giovani maschi, quando avranno completato la prova di progenie e avranno confermato la loro valutazione basata sulle informazioni dei genitori. A tale scopo la conoscenza esatta delle genealogia degli animali in lattazione è indispensabile.

La peculiarità dello schema di selezione della razza Sarda, è la combinazione di una certa quota di FA con la MN controllata, cioè la costituzione durante la stagione riproduttiva di gruppi di pecore con un solo ariete.

L'impiego della FA, ancorché negli ovini presenti dei problemi specifici, è largamente giustificato dai vantaggi apportati ai programmi selettivi. Essa permette infatti: a) la

distribuzione in diversi ambienti della progenie dei giovani arieti, e dunque una più precisa valutazione anche dei riproduttori utilizzati in MN, attraverso la creazione di legami genetici tra allevamenti; b) la realizzazione di accoppiamenti programmati tra le migliori pecore ed i migliori arieti. Negli ultimi anni si è assistito ad una crescita regolare del numero di aziende che aderiscono al programma di FA ed è aumentata inoltre la quota di queste che realizzano risultati di fertilità superiori al 50%, più che soddisfacenti nelle nostre condizioni d'allevamento. Attualmente si realizzano circa 13,000 (Salaris *et al.*,2008) inseminazioni strumentali l'anno, per il 40 % da arieti miglioratori e il 60 % da arieti in prova. Allo stato attuale, praticamente tutti gli allevamenti del LG, sono interessati dalla FA o direttamente o per il fatto che utilizzano in MN discendenti di FA. Lo schema, così concepito, consente attualmente alla razza Sarda di ottenere progressi genetici annui di circa 2 litri di latte che la pongono tra le migliori razze europee.

Anche per la razza Sarda si pone il problema dell'introduzione nello schema dei nuovi caratteri legati alla riduzione dei costi di produzione, (attitudine alla mungitura meccanica, longevità e altri caratteri funzionali), alla sicurezza alimentare (riduzione del rischio di contaminazione del latte con residui di trattamenti medicinali attraverso il miglioramento della resistenza alle mastiti e ad altre infezioni parassitarie e resistenza alle malattie da prione (EST) e a altre potenziali zoonosi quali la paratubercolosi,) ,alle caratteristiche nutrizionali (contenuto nel latte di acidi grassi con effetti sulla salute umana quali il CLA).

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli sforzi per l'introduzione di altri obiettivi di selezione. In particolare sono state avviate le rilevazioni fenotipiche, per il tenore in grasso e proteine del latte, il contenuto in cellule somatiche (CCS).

Dal 2003 è iniziata la selezione per la resistenza alla Scrapie con risultati soddisfacenti: le frequenze di alleli e genotipi resistenti sono notevolmente aumentate negli animali iscritti al

Libro Genealogico della razza senza tuttavia penalizzare eccessivamente il progresso genetico per i caratteri produttivi (Salaris *et al.*,2007).

Nel 2004 è stata realizzata la prima valutazione genetica sperimentale per i caratteri di morfologia mammaria (Casu *et al.*,2006). Come descritto in precedenza, la misura accurata dei fenotipi negli ovini risulta problematica anche per caratteri produttivi quali il tenore in grasso e proteine che nei bovini da latte vengono misurati routinariamente e ai quali si applica con successo l'approccio selettivo classico. Tale limite è ancora più evidente per i nuovi obiettivi di selezione che richiedono spesso misure complesse (analisi degli acidi grassi, misure immunologiche etc.). Sono quindi state avviate anche in questa razza ricerche tese all'individuazione di QTL o geni implicati nel determinismo genetico di questi caratteri (Usai,2008; Allain *et al.*,2006; Carta *et al.*,2006; Casu *et al.*,2004; Carta *et al.*,2003b; Carta *et al.*,2002).

L'esperienza accumulata dai gestori dello schema e dagli allevatori nella realizzazione della selezione per la resistenza alla Scrapie si rivelerà senz'altro utile quando saranno disponibili altre informazioni molecolari da utilizzare a scopi selettivi. L'applicazione dei modelli teorici che consentono di limitare gli effetti negativi per la selezione per i caratteri produttivi in presenza di una selezione per un gene maggiore con effetto su un carattere di sanità animale ha ottenuto buoni risultati consentendo tra l'altro di affrontare e risolvere alcune problematiche che potranno ripresentarsi in futuro. Oltre agli aspetti relativi alla modellizzazione dello schema di selezione, sono state affrontate anche problematiche di natura organizzativa e economica. In particolare, la disponibilità di campioni biologici per le analisi molecolari ha costituito uno degli ostacoli fondamentali per la realizzazione delle attività. Da questo punto di vista, notevoli sforzi organizzativi dovranno essere compiuti dalle Associazioni Allevatori per la creazione di banche del DNA che consentano in un primo

tempo di realizzare le sperimentazioni necessarie per la ricerca di geni o marcatori e la stima dei loro effetti e in un secondo tempo l'applicazione dei risultati. In questo senso, il ricorso a materiale biologico differente dal sangue, il cui prelievo prevede sempre la presenza del veterinario, quali il bulbo pilifero o il latte dei controlli funzionali può ridurre notevolmente i costi di prelievo e di stoccaggio.

3.1.2 Schema di selezione della capra Sarda

La capra Sarda, autoctona della Sardegna, ha origini antiche, essendo presente nell'Isola da tempi remoti, seppure con taglia più piccola dell'attuale (Zedda *et al.*,1999). Ascrivibile alle razze "Mediterranee", presenta caratteristiche morfologiche non omogenee per colore del mantello, forma della mammella, caratteristiche delle corna, dimensione e portamento delle orecchie. Sulla base di questa eterogeneità è stata proposta una classificazione in tre subpopolazioni, diversamente distribuite nel territorio regionale (Brandano e Piras, 1978), ma comunque tutte riconducibili ad un unico ceppo genetico (Macciotta *et al.*,2000). Oltre a questa variabilità morfologica, occorre aggiungere una notevole eterogeneità nei caratteri produttivi, quantitativi e qualitativi. La selezione genetica, fin'ora operata dai singoli allevatori, ha privilegiato le produzioni della quantità del latte, modificando, almeno nella frequenza, i caratteri morfologici. In alcuni casi, essi hanno anche selezionato in relazione alla morfologia degli animali, per motivi estetici (colore del mantello), pratici (presenza/assenza di corna) o funzionali (forma della mammella). In tempi relativamente recenti gli allevatori per incrementare la produzioni del latte, peraltro non trascurabili, in

considerazione delle difficili condizioni geo-pedologiche e climatiche del territorio, hanno operato l'incrocio con diverse razze più produttive, principalmente con la Maltese (Pazzola *et al.*,2003; Ligios *e coll.*,2004; Usai *e coll.*,2004). In questo modo sono stati introdotti alcuni caratteri tipici di quest'ultima, come il mantello bianco con la testa nera e le orecchie grandi e pendenti (Asso.Na.Pa.,1998). Studi precedenti hanno messo in luce l'esistenza di differenze produttive (Macciotta *e coll.*,2000), morfologiche (Branca e Casu,1986; Vacca *e coll.*,2003) e biometriche tra animali provenienti da aree con caratteristiche orografiche ed altimetriche differenti (Macciotta *e coll.*,2002).

L'Agenzia per la Ricerca AGRIS ha avviato da diversi anni un programma di ricerca mirato a caratterizzare la popolazione caprina presente in Sardegna e a formulare una proposta organica di gestione, conservazione e/o miglioramento genetico. L'approccio seguito, come per altre specie zootecniche dell'isola (Porcu *e coll.*,2005b; Sechi *e coll.*,2005) prevede le seguenti fasi:

- ✚ ricognizione storica sui tipi genetici locali e i sistemi di allevamento utilizzati in passato nell'Isola;
- ✚ caratterizzazione del territorio, del sistema di allevamento e dei prodotti tipici;
- ✚ valutazione produttiva e morfo-funzionale degli animali;
- ✚ caratterizzazione genetica attraverso loci marcatori neutrali (microsatelliti), DNA mitocondriale, cromosoma Y;
- ✚ identificazione e studio dei polimorfismi in geni di interesse ;
- ✚ costituzione di allevamenti nucleo e banche del germoplasma;
- ✚ elaborazione di piani di conservazione e/o miglioramento genetico per i tipi genetici locali.

Nell'ambito di questi studi è stato dimostrato che l'allevamento caprino sardo presenta nell'insieme una notevole arretratezza sia strutturale che gestionale (Usai *et al.*,2006,a). Inoltre attraverso la combinazione tra le informazioni fornite dagli allevatori, i profili fenotipici degli animali e l'analisi del genotipo di questi a 17 marcatori microsatelliti è stato possibile identificare un gruppo di allevamenti dove viene attualmente ancora allevato il tipo genetico autoctono (Sechi *et al.*,2004; Sechi *et al.*,2007).

Tali risultati hanno recentemente condotto all'istituzione del registro anagrafico della "Capra Sarda Primitiva" che costituisce il primo passo per l'avvio di un programma di gestione e salvaguardia che integrato con una politica di gestione del territorio e valorizzazione dei prodotti tradizionali possa costituire la base per un rilancio del comparto caprino nell'isola.

4. Scopo del lavoro

4 Scopo del lavoro

Lo scopo di questo lavoro è quello di accertare la possibilità di usare i campioni di latte come fonte di DNA per eseguire analisi genetiche.

Esistono, infatti, ovvie difficoltà tecniche nella raccolta di campioni di sangue, specialmente se da un gran numero di individui distribuiti in numerosi allevamenti. La possibilità di analizzare direttamente il latte al posto dei campioni di sangue e dei bulbi piliferi, presenta dei vantaggi da non trascurare, qualunque sia il marcatore genetico e lo scopo ultimo dell'analisi. Infatti:

- ✚ la raccolta del latte fa parte della routine giornaliera e quindi non è richiesto personale specializzato o aiuti particolari.
- ✚ la stabilità dei campioni congelati, per lunghi periodi, rende più facile la spedizione ai laboratori di analisi ;

A tale scopo le mie ricerche si sono concentrate principalmente sulla messa a punto di un protocollo d'estrazione del DNA dalle cellule somatiche del latte, sia caprino che ovino, facilmente applicabile in routine, affidabile, sicuro e soprattutto economico.

Come visto, una delle possibili applicazioni del DNA estratto dalle cellule somatiche del latte è quella di poter effettuare analisi molecolari per eseguire test di paternità o eventualmente procedere all'identificazione del genitore vero (o più probabile) in presenza di più di un possibile padre. La disponibilità di un test molecolare per l'attribuzione delle paternità consentirebbe agli allevatori di affrancarsi dalla faticosa gestione dei gruppi di monta e permetterebbe, in ultima analisi, di accrescere il numero di individui della popolazione con genealogia nota e quindi l'accuratezza delle valutazioni genetiche. Per tale motivo il secondo

obiettivo di questo lavoro è stato quello di identificare un gruppo di marcatori microsatelliti che si prestassero alla corretta attribuzione delle paternità negli allevamenti ovis di razza Sarda e di stabilire le condizioni analitiche più efficienti ed economiche per un loro eventuale utilizzo in routine.

Lo studio si è svolto in stretta collaborazione con l'Associazione Regionale Allevatori Sardegna (A.R.A.S.) che ha messo gentilmente a disposizione il proprio laboratorio per lo svolgimento delle analisi e la messa a punto delle tecniche analitiche.

Numerose analisi sono state svolte presso il laboratorio di Biologia Molecolare del Dipartimento per le Produzioni Animali di AGRIS Sardegna, presso il quale ho svolto la mia attività negli ultimi anni nell'ambito del progetto MIPAF "Studio ed eradicazione della Scrapie tramite selezione dei genotipi resistenti nelle razze ovi-caprine italiane" collaborando alle analisi di determinazione del genotipo al locus Prp negli ovis di razza Sarda.

5. Materiale e Metodi

5 Materiale e Metodi

5.1 Laboratorio Associazione Regionale Allevatori (A.R.A.)

L'Associazione Regionale Allevatori Sardegna (A.R.A.S.) è stata costituita nel 1980, allo scopo di attuare i programmi regionali di sviluppo e l'assistenza tecnica nel settore dell'allevamento. Pertanto l'A.R.A.S collabora con gli altri Enti del Sistema Agricolo Regionale e con gli Uffici competenti della Regione alla definizione delle esigenze del comparto e alla stesura di progetti e programmi d'intervento. Inoltre, l'Associazione gestisce, per conto della Regione Autonoma della Sardegna, diversi programmi e progetti che mirano allo sviluppo del comparto zootecnico.

Il sistema informatico di cui è dotata raccoglie in varie Base-Dati informazioni relative ai risultati delle attività di assistenza tecnica offerti agli utenti del comparto, ai risultati delle analisi condotte sui campioni di latte e dei controlli funzionali effettuati sugli animali iscritti ai Libri Genealogici.

L'A.R.A.S. svolge un'attività capillare sul territorio isolano attraverso équipes di agronomi e veterinari.

L'A.R.A.S. ha messo a disposizione per questo lavoro, oltre che la base, i campioni di latte, le apparecchiature scientifiche, presenti nel laboratorio di analisi del latte di Oristano, anche la collaborazione dei suoi dipendenti.

Tra gli strumenti utilizzati, principalmente:

- ✚ Sequenziatore Automatico in elettroforesi capillare mod. GENETIC ANALYZER 3100 con 16 capillari (Applied Biosystem Hitachi);
- ✚ Cappa PCR CABINET II (PBI);
- ✚ Centrifuga refrigerata Heraeus Multifuge 1 L-R ;
- ✚ Termociclatore GENE AMP PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystem).

5.2 Estrazione del DNA dai leucociti delle cellule somatiche del latte

5.2.1 Metodi di estrazione del DNA disponibili e loro confronto

La messa a punto di un metodo di estrazione del DNA dalle cellule somatiche del latte ha previsto una prima valutazione dei protocolli disponibili, al fine di escludere quelli che richiedevano tempi troppo lunghi, costi troppo elevati e manualità troppo impegnativa da parte dell'operatore. Questo anche e soprattutto in previsione di un numero elevato di analisi in tempi di esecuzione ridotti.

L'attenzione si è dapprima rivolta alle metodiche già testate per l'estrazione del DNA dalle cellule somatiche del latte (in particolare a quella salina) e alla metodica rapida (Rudbeck and Dissing, 1998) attualmente utilizzata presso l'AGRIS per l'estrazione del DNA dal sangue intero e dal bulbo pilifero.

5.2.1.1 *Metodica salina (D'Angelo et al.,2007).*

Questa metodica, testata da D'Angelo *et al.*,(2007) per l'estrazione del DNA dalle cellule somatiche del latte di capra, prevede: una centrifugazione iniziale di 20 ml di latte per 30' a 3000 rpm a 4°C, per l'eliminazione del grasso, l'aggiunta di 20 ml di NaCl 0,9% al pellet, una centrifugazione a 3000 rpm per 15' alla temperatura di 4°C, l'addizione di 40 ml di soluzione Lysis Buffer (0,32M Saccarosio, Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 5mM, Triton 1%), seguita da un'altra centrifugazione della durata di 30' a 3000 rpm a 4°C e l'addizione di 10 ml di Fisio-Buffer (0,075M NaCl, 0,25M EDTA) al pellet prima di essere nuovamente centrifugato, a seguire l'aggiunta di 3 ml di Buffer A (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 2mM), SDS 10% 100µl, proteinasi k (10 mg/ml) 40µl e l'incubazione dei campioni a 65°C per 1h. Al termine l'aggiunta di 0,5 ml di NaCl saturo 5M, un'agitazione poi una centrifugazione e ancora l'aggiunta prima dell'Isopropanolo poi di Etanolo al 70% per i lavaggi successivi, un'altra centrifugazione a 4°C per 10' a 3000 rpm, e infine la sospensione del pellet in TE.

5.2.1.2 *Metodica salina (Ernst e Dentin,1992; Aleandri et al.,1994).*

La metodica salina messa a punto da Ernest e Dentine,(1992) per l'estrazione del DNA dal latte bovino è stata successivamente modificata da Aleandri e Di Gregorio,(1994) per l'applicazione a quello di capra.

Anche questa metodica comporta: la centrifugazione a 4°C per 30' alla velocità di 3000 rpm di 20 ml di latte; la risospensione del pellet con 49 ml di Lysis Buffer (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M); la centrifugazione a 4°C per 20' a 2500 g; l'aggiunta di 10 ml di NaCl-EDTA, 3 ml di Tris-HCl-EDTA, 100µl di SDS 10% e 40µl di proteinasi k (10 mg/ml) e l'incubazione dei

campioni per 1h a 65°C. Al termine si procede a l'aggiunta di 500µl di NaCl 5M, la centrifugazione e l'addizione alla soluzione acquosa di 5 ml di Isopropanolo, per la precipitazione del DNA; il pellet così ottenuto viene fatto essiccare a temperatura ambiente per essere poi conservato con 500µl di Tris-EDTA 1M.

5.2.1.3 Metodica rapida (Rudbech e Dissing, 1998).

Una delle metodiche di estrazione più economiche, in termini di costi dei reagenti, tempi di lavoro, manualità poco impegnativa è quella alcalina rapida, spesso applicata al sangue o al bulbo pilifero.

I reagenti base in tale metodica sono:

- ✚ NaOH 200 mM
- ✚ Mix TrisHCl 100 mM/HCl 200mM.

NaOH (Idrossido di Sodio) ha la funzione di aumentare il pH, facilitando così la rottura delle cellule nucleate; il mix Tris-HCl/HCl è una soluzione tampone che riporta il pH vicino alla neutralità e aiuta a mantenere il DNA nelle condizioni ottimali.

5.2.1.3.1 *Metodica rapida su Sangue*

Oltre al NaOH 200 mM e al mix di TrisHCl 100mM/HCl 200mM si utilizza il buffer di lisi NE (NaCl 10mM, EDTA 10mM); NE è una soluzione ipotonica, la cui funzione è quella lisare i globuli rossi.

I campioni di sangue vengono raccolti in provette vacutainer da 5 ml contenenti l'anticoagulante EDTA.

In successione vengono eseguiti i seguenti passaggi:

1. vengono rimossi i globuli rossi attraverso i lavaggi effettuati con il tampone di lisi NE (NaCl 10mM, EDTA 10mM);
2. i campioni vengono quindi incubati a 65°C per 2 h con l'aggiunta di NaOH 200mM, per indurre la lisi cellulare;
3. infine si aggiunge il TrisHCl 100mM/HCl 200mM, in rapporto di 1:1 al fine di riportare il pH ad un valore prossimo alla neutralità.

5.2.1.3.2 *Metodica rapida Bulbo pilifero*

In successione si esegue la seguente procedura:

Venti bulbi vengono tagliati all'interno di una provetta tipo Eppendorf e vengono incubati a 65°C per 1h con l'aggiunta di NaOH 200mM; quindi si aggiunge il TrisHCl 100mM/HCl 200mM, in rapporto 1:1, per riequilibrare il pH e riportarlo alla neutralità.

Questa metodica è utilizzata presso il laboratorio di Biologia Molecolare AGRIS, in routine per l'ottenimento del DNA per le analisi delle varianti genetiche legate alla sensibilità e resistenza alla Scrapie.

In questo laboratorio, la metodica rapida applicata al sangue e al bulbo pilifero si è rivelata valida, ripetibile, veloce e poco dispendiosa. La quantità del DNA ottenuto (misurata con lo strumento NanoDrop) ha riportato concentrazioni comprese in un range di 40 ng/μl e 132ng/μl per il DNA estratto da sangue intero e diluito in H₂O sterile nel rapporto di 2:50, e di 35 ng/μl e 96 ng/μl per quello estratto dal bulbo pilifero, diluito in H₂O sterile nel medesimo rapporto.

5.4. Metodiche di estrazione testate

Le 3 metodiche sopracitate sono state inizialmente testate presso i laboratori A.R.A.S. di Oristano su 10 campioni di latte, sia ovino che caprino. La valutazione della loro efficacia è stata fatta attraverso una corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0,8% di rispettivamente 4 campioni per ciascuna tecnica applicata. Con la metodica D'Angelo *et al.*,(2007) 4 su 4 e 3 su 4 dei campioni testati, caprini e ovini rispettivamente, hanno presentato una banda netta che ha migrato in corrispondenza del Ladder da 50ng. Lo stesso risultato è stato osservato caricando, sempre sul gel allo 0,8%, 4 campioni, sia ovini che caprini, estratti con la salina secondo Ernst e Dentine,(1992) e Aleandri *et al.*,(1994).

Sebbene le due metodiche saline abbiano mostrato ottimi risultati, la scelta della metodica di estrazione è ricaduta sulla rapida poiché, nonostante la quantificazione su gel non abbia dato esito completamente positivo (solo 2 campioni su 4 hanno presentato una banda netta attorno ai 50 ng) essa è risultata la più economica e la più veloce e quindi è stata ritenuta la più idonea per suo eventuale utilizzo futuro applicabile in routine.

La messa a punto del metodo di estrazione rapida del DNA dalle cellule somatiche del latte ha implicato una serie di successive modifiche apportate in seguito ai risultati intermedi ottenuti. Le diverse prove realizzate possono essere riassunte in due esperimenti.

5.2.2 Esperimento 1:

Centosessanta campioni di latte di capra (30 ml), prelevati da diversi allevamenti, in corrispondenza dei controlli funzionali, sono stati addizionati di Bronopol e congelati a -20°C per un mese, prima di essere processati con la metodica rapida. Il protocollo di estrazione ha previsto, dopo scongelamento degli stessi, la centrifugazione della durata di 30' a 3000 rpm alla temperatura di 4°C, l'eliminazione del grasso superficiale, la sospensione del pellet con l'NE, cui ha fatto seguito una centrifugazione della durata di 15' a 4°C e 3000 rpm. Eliminato il surnatante, i campioni, con l'aggiunta di 50 µl di NaOH 200mM, sono stati incubati a 65°C per 2 h. Dopo l'incubazione è stato aggiunto un volume uguale di Tris-HCl 100nM/HCl 200mM. I campioni, diluiti in H₂O nel rapporto di 2:50, sono stati conservati in congelatore a -20° C.

L'efficacia del protocollo di estrazione è stata valutata in seguito all'analisi dei prodotti delle taglie di PCR di 3 dei 22 microsatelliti del progetto ECONOGENE (**Tabella**

5.1.)(<http://www.econogene.eu/>).

Allo scopo è stata utilizzata una quantità di DNA pari a circa 50ng per la reazione di PCR:

Tutte le reazioni di PCR sono state effettuate con un volume finale di 20 µl; lo strumento utilizzato PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) e il profilo termico era:

- ✚ 30-50 ng di DNA,
- ✚ 1 X PCR Buffer (KCl 50 mM, TrisHCl 10 mM pH=8.3),
- ✚ 1.5 mM MgCl₂,
- ✚ 200 µM dNTPs,
- ✚ 0.5 U Taq Polymerase
- ✚ 0.5 µM per ciascun primer
- ✚ H₂O a volume

I microsatelliti utilizzati sono stati i seguenti

| Microsatellite | Sequenza del primer (5'-3') | Riferimento Bibliografico | Marcatur Fluorescer | Taglia |
|----------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|---------|
| ILSTS087 | AGCAGACATG | Kemp <i>et al.</i> 1995 | NED | 151-183 |
| | ATGACTCAGC | | | |
| | CTGCCTCTTTT | | | |
| | CTTGAGAGC | | | |
| ILSTS011 | GCTTGCTACA | Brezinsky <i>et al.</i> 1993 | PET | 260-284 |
| | TGGAAAGTGC | | | |
| | CTAAAATGCA | | | |
| | GAGCCCTACC | | | |
| MAF65 | AAAGGCCAGAGTA | Buchanan <i>et al.</i> 1994 | NED | 116-146 |
| | TGCAATTAGGAG | | | |
| | CCACTCCTCCTGA | | | |
| | GAATATAACATG | | | |

Tabella 5.1 Microsatelliti, sequenza e marcatura fluorescente dei primer, taglia dell'amplificato e relativi riferimenti bibliografici.

5.2.3 Esperimento 2

Come verrà mostrato nel capitolo 6, i risultati ottenuti nell'esperimento precedente hanno indotto ad apportare alcune modifiche al protocollo di estrazione originale. L'estrazione rapida modificata (metodica rapida 2) infatti si differenzia dalla metodica rapida 1 principalmente per la sostituzione dell'NE con il PBS (Phosphate buffered saline). Si tratta di una soluzione salina contenente Cloruro di Sodio, Sodio Fosfato e Potassio Fosfato, che aiuta a mantenere costante il pH. Il PBS ha molti usi soprattutto perchè è isotonico e non tossico per le cellule, per questo motivo viene utilizzato anche come soluzione di lavaggio per le cellule stesse. Si trova in commercio sottoforma di polvere o in pastiglie, già pronto da sciogliere in acqua.

La seconda modifica apportata è stata l'aggiunta di una quantità doppia del mix Tris-HCl 100nM/HCl 200mM. Nella metodica rapida originale infatti la quantità addizionata era pari a 50 µl (un rapporto di 1:1 con l'NaOH).

La metodica rapida 2 è stata applicata al latte di pecora. Da 36 animali di razza Sarda, è stato prelevato un campione di latte di 70 ml al quale è stato aggiunto il conservante antimicrobico Bronopol. I campioni sono stati refrigerati per l'intera giornata a 4°C e sottoposti ad analisi qualitativa (Tabella 5.2).

Per l'estrazione del DNA in giornata con la metodica rapida 2, sono stati utilizzati 20 ml di ciascun campione. Al fine di valutare la possibilità di procedere allo stoccaggio del latte e ad un'estrazione differita del DNA rispetto al momento del prelievo, i 36 campioni originari sono stati conservati a -20°C, per 15 giorni. Dopo scongelamento un'aliquota di 20 ml è stata sottoposta ad una nuova estrazione con la metodica rapida 2, mentre un'altra è stata processata con un Kit di estrazione commerciale (a scopo comparativo). A causa

dell'insufficiente quantità di latte in alcuni campioni, solo 26 dei 36 originari, sono stati trattati con il kit commerciale. Tra i vari kit disponibili in commercio è stato utilizzato il NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) attenendosi al protocollo fornito dalla ditta produttrice e utilizzando 15 ml di latte. Il DNA estratto è stato quindi conservato a -20°C.

| n. campione | % Grasso | % Proteine Tot | CCS (cellule*10 ³ /ml) | pH latte |
|-------------|----------|----------------|--------------------------------------|----------|
| 1 | 8,05 | 6,10 | 549 | 6,61 |
| 2 | 13,81 | 8,53 | 1078 | 6,47 |
| 3 | 10,39 | 7,57 | 892 | 6,58 |
| 4 | 9,95 | 6,67 | 174 | 6,70 |
| 5 | 13,33 | 7,66 | 297 | 6,58 |
| 6 | 8,86 | 6,09 | 351 | 6,57 |
| 7 | 9,10 | 5,98 | 8349 | 6,45 |
| 8 | 10,75 | 8,25 | 913 | 6,50 |
| 9 | 14,06 | 7,21 | 3030 | 6,34 |
| 10 | 10,52 | 8,42 | 1046 | 6,70 |
| 11 | 8,36 | 7,19 | 160 | 7,00 |
| 12 | 9,79 | 6,07 | 2083 | 6,70 |
| 13 | 10,01 | 8,87 | 373 | 6,60 |
| 14 | 12,75 | 5,43 | 598 | 6,50 |
| 15 | 8,23 | 5,92 | 505 | 6,83 |
| 16 | 10,02 | 6,24 | 159 | 6,70 |
| 17 | 8,55 | 6,08 | 759 | 6,78 |
| 18 | 8,24 | 5,47 | 248 | 6,60 |
| 19 | 10,73 | 6,23 | 619 | 6,60 |
| 20 | 12,95 | 6,19 | 212 | 6,50 |
| 21 | 7,90 | 8,57 | 643 | 6,81 |
| 22 | 8,94 | 5,08 | 353 | 6,72 |
| 23 | 10,31 | 8,19 | 428 | 6,45 |
| 24 | 12,59 | 7,26 | 292 | 6,43 |
| 25 | 8,55 | 6,54 | 7509 | 6,20 |
| 26 | 8,36 | 7,18 | 317 | 6,65 |
| 27 | 7,58 | 6,59 | 733 | 6,60 |
| 28 | 11,83 | 6,70 | 305 | 6,60 |
| 29 | 11,86 | 6,36 | 232 | 6,43 |
| 30 | 10,29 | 7,85 | 1700 | 6,72 |
| 31 | 8,59 | 6,88 | 876 | 6,88 |
| 32 | 8,80 | 6,92 | 2482 | 6,50 |
| 33 | 7,30 | 7,62 | 15862 | 5,80 |
| 34 | 8,01 | 6,54 | 817 | 6,50 |
| 35 | 3,41 | 10,60 | 20880 | 5,70 |
| 36 | 9,72 | 6,28 | 11732 | 6,09 |

Tabella 5.2 Valori del tenore in grasso, in proteine totali, delle CCS e pH dei campioni di latte ovino processati con la metodica rapida 2.

5.3 Quantificazione del DNA

In questo ultimo esperimento la soluzione contenente l'acido nucleico estratto con la metodica rapida 2 è stata valutata sia in termini quantitativi che qualitativi, nei seguenti modi:

- 1) analisi attraverso corsa elettroforetica su gel d'agarosio
- 2) analisi allo spettrofotometro
- 3) analisi molecolari

5.3.1 Analisi attraverso corsa elettroforetica su gel d'agarosio

L'elettroforesi è stata effettuata su un gel di Agarosio preparato allo 0.8% e per la quantificazione sono stati utilizzati marker-DNA di riferimento presenti in quantità nota, rispettivamente di 20ng, 50ng, 100ng e 150ng. Per la colorazione e la visualizzazione delle bande, dopo la corsa elettroforetica a 80V per 20', il gel è stato immerso in una soluzione contenente lo 0,015% di Syber-Safe, una soluzione alternativa al comune Bromuro di Etidio, meno mutageno, ma altrettanto sensibile alla colorazione.

5.3.2 Analisi allo spettrofotometro

La concentrazione e la qualità dell'Acido Nucleico è stata determinata con l'utilizzo del Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technology) che ha permesso di lavorare con microvolumi di campione, fino a 1µl. Questo strumento presenta rispetto agli strumenti standard il vantaggio di dover eliminare totalmente l'impiego delle Cuvette e il ricorso a continue

diluizioni. Il risultato finale è una quantificazione molto accurata della concentrazione del DNA ed una misurazione della densità ottica del campione. La tensione superficiale viene utilizzata per mantenere sulla colonna il campione liquido. Contemporaneamente viene effettuata la valutazione quantitativa tramite due fibre ottiche in meno di 10 secondi. Lo spettro e le relative analisi vengono visualizzati sullo schermo del PC ed archiviati sotto forma di fogli Excel. Lo strumento specifica automaticamente la lettura del campione a 260 – 280 – 230 nm di lunghezza d'onda e la concentrazione del DNA con i relativi rapporti delle assorbanze

che indicano il grado di purezza del campione analizzato



Figura 5.1 Strumento spettrofotometrico NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technology)

5.3.3 Analisi molecolari

Le analisi molecolari sono state eseguite usufruendo dei microsatelliti scelti per raggiungere il secondo obiettivo di questo lavoro.

Per le reazioni di PCR è stata prelevata una quantità pari a 50 ng di DNA, sia di quello estratto dal latte fresco, ossia quello refrigerato per l'intera giornata a 4°C, che di quello precedentemente congelato.

Inoltre su questi campioni è stata eseguita la determinazione degli alleli del gene della proteina prionica PrP ovina ai codoni 136, 154 e 171. L'analisi è stata eseguita utilizzando il protocollo Taqman Real Time PCR e lo strumento ABI PRISM 7000.

5.4 Messa a punto di un sistema di marcatori per l'attribuzione delle paternità nella razza Sarda

Il secondo obiettivo di questo lavoro era la messa a punto di un set di marcatori per l'attribuzione delle paternità negli ovini di razza Sarda. Le caratteristiche che un gruppo di marcatori dovrebbe avere per tale scopo sono: polimorfismo, efficienza analitica e possibilità di essere processati insieme al fine di ridurre i costi e il numero di reazioni di PCR (Glowatzki-Mullis *et al.*,1995,2007; Baumung *et al.*,2006; Freeman *et al.*,2005; Sechi *et al.*,2004; Grigaliunaite *et al.*,2003; DeNise *et al.*,2003; Tozaki *et al.*,2001,b; Mura *et al.*,2002; Arruga *et al.*,2001)

Nell'ambito di un precedente progetto di ricerca ("Genesheepsafety", Barillet *et al.*,2006b), mirato all'identificazione di geni che influenzano i caratteri di interesse economico negli ovini, era stato messo a punto un panel di 145 microsatelliti (Mura *et al.*,2002). Il genotipo a questi loci era stato determinato per una popolazione sperimentale costituita da 975 pecore backcross ottenute dall'accoppiamento di 10 arieti F1 Sardo-Lacaune con pecore di razza Sarda. Le frequenze alleliche nella razza Sarda (p_i , $i=1$ al numero di alleli) sono state calcolate a partire dal genotipo delle femmine backcross per le quali è stato possibile individuare l'allele ricevuto dal padre F1 e dunque accertare l'origine Sarda dell'altro allele. La determinazione analitica del genotipo delle madri Sarde non era stata infatti realizzata. Qualora tra la progenie di un determinato padre fosse riscontrata la presenza di diverse figlie incompatibili omozigoti per alleli diversi si è supposta la presenza nella popolazione di un allele nullo, cioè di una mancata amplificazione del primer.

Il contenuto informativo di ciascun microsatellite è stato definito sulla base dell'eterozigotà attesa ($H_e=1-\sum p_i^2$) e del numero vero (N_a) e effettivo ($N_e=(1/(1-H_e))$) di alleli (Kimura & Crow,1964).

I dieci microsatelliti risultati più informativi sono stati scelti per costituire il set dei marcatori per l'attribuzione delle paternità negli ovini di razza Sarda.

5.4.1 Organizzazione dei microsatelliti in multiplex.

L'analisi dei microsatelliti viene eseguita al sequenziatore automatico il cui funzionamento consiste in una corsa elettroforetica in combinazione con colori fluorescenti (Figura 5.2). I prodotti di PCR sono marcati con fluorofori durante la reazione di amplificazione. Gli alleli vengono identificati tramite l'emissione di fluorescenza dei fluorofori stessi quando vengono colpiti da un laser ad argon durante la corsa elettroforetica in un medium denaturante.

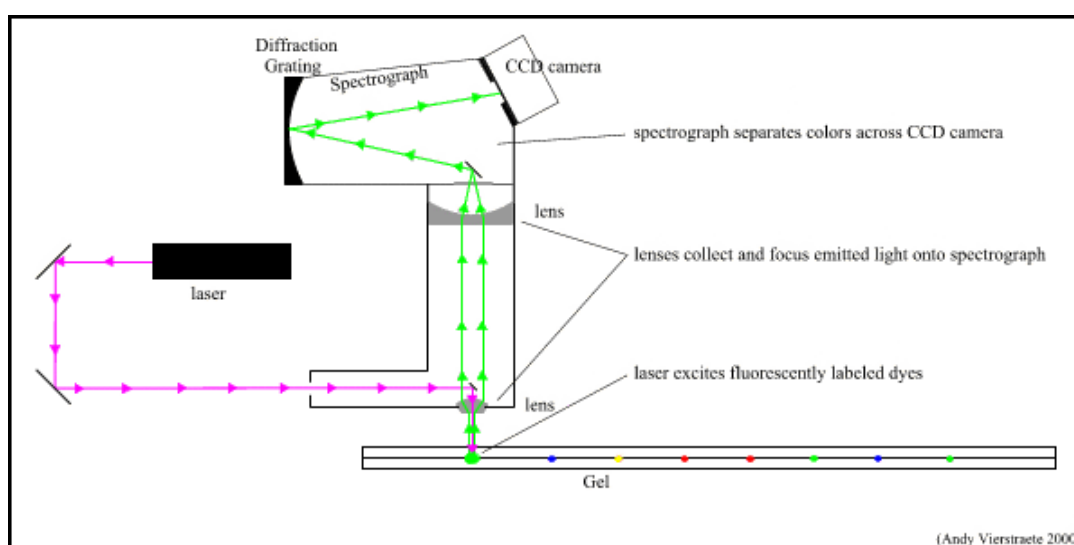


Figura 5.2 Schema del sistema di rilevazione della fluorescenza su un sequenziatore automatico- I frammenti fluoriscinati migrano in base al loro peso molecolare Il laser eccita la molecola fluorescente che riemette luce ad una particolare lunghezza d'onda rilevata da uno spettrografo e tradotta in colore.

Con questo sistema le reazioni di PCR possono essere miscelate insieme e i prodotti (alleli ai diversi microsatelliti) possono essere distinti in base alla taglia del loro amplificato o alla marcatura del fluoroforo. Il metodo più comune di marcatura è incorporare il fluoroforo all'estremità 5' di uno dei primer per la PCR: In questo modo dopo la reazione di PCR uno dei filamenti del frammento amplificato sarà marcato. In condizioni denaturanti, come nella

corsa elettroforetica al sequenziatore automatico, i due filamenti vengono separati in base al loro peso molecolare e solo il filamento fluorescente verrà rilevato tramite la CCD (charge coupled device) che separa l'emissione di fluorescenza dei vari fluorofori traducendola in colore.

La tecnologia di “multiplexare” le reazioni di PCR, combinando insieme quanti più primer possibili, consiste nell'attribuire diverse marcature, in corrispondenza di quei primer che presentano una similarità di taglia dei loro prodotti di amplificazione.

Nel caso in cui le temperature di annealing dei diversi primer non siano compatibili, non potendosi realizzare un'amplificazione simultanea, è possibile ricorrere alla tecnica del multiloading, che consiste nel combinare nella stessa corsa elettroforetica i singoli prodotti finali di amplificazione.

I microsatelliti utilizzati in questo studio sono rappresentati in Tabella 5.3 con le corrispondenti sequenze dei primer e riferimenti bibliografici:

| microsatellite | Sequenza del primer (5'-3') | Riferimenti bibliografici |
|-----------------------|--|----------------------------------|
| MCM058 | CTGGGTCTGTATAAGCACGTCTCC CAGAACAATAAACGCTAAACCAGAGC | Hulme <i>et al.</i> ,1994-1995 |
| LSCV06 | GACTTCTCCCAGTAGGCTGG GCTGTTCGGAAGTGATGTAG | Maddox <i>et al.</i> ,2000 |
| BM6444 | CTCTGGGTACAACACTGAGTCC TAGAGAGTTTCCCTGTCCATCC | Bishop <i>et al.</i> ,1994 |
| BMS2213 | ATGGGCAGCTTAGGGATTG CTTCAAGAGCCTTCAGTGGG | Stone <i>et al.</i> ,1995 |
| CSSM43 | AAAACCTCTGGGAACTTGAAAATA GTTACAAATTTAAGAGACAGAGTT | Moore <i>et al.</i> ,1994 |
| MCM120 | TAGCTGTCAGGCCGTGCAGT GAGGTAAGTCTATAAGGCTCCCCTG | Smith <i>et al.</i> ,1995 |
| OLADRB | CTGCCAATGCAGAGACACAAGA GTCTGTCTCCTGTCTTGTCATC | Blattman & Beh,1992 |
| BM2252 | GAGGCTCGCTTTTGTGCTAC CCATAAGCTTGCAAAGAATCG | Kappes <i>et al.</i> ,1997 |
| MCM373 | GGGTTTACCAGATGTCTGCTTGT TATTTGTCCAGCTGGTTGCAG | Hulme <i>et al.</i> ,1995 |
| BMS360 | ACAAAACCACTTTCTTAGCAAACA CTGGGTCTTCATGGTAGGGA | Rejduch <i>et al.</i> ,2004 |

Tabella 5.3 Microsatelliti, sequenza dei primer e relativi riferimenti bibliografici

La messa a punto della multiplex-PCR ha comportato la verifica per ciascun microsatellite delle condizioni di amplificazione, in particolare la temperatura di annealing, il range esatto della taglia dei prodotti di PCR, l'attribuzione di una marcatura fluorescente e infine la compatibilità o meno degli stessi se messi in un'unica reazione.

L'analisi molecolare delle pecore backcross e dei rispettivi padri erano state eseguite utilizzando il sequenziatore automatico ABI-PRISM 377 (Applied Biosystem); poiché nel laboratorio di Biologia Molecolare del DIRPA è attualmente in uso un sequenziatore

automatico ABI PRISM® 3130- Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) che permette di utilizzare un fluorocromo in più e presenta un sistema elettroforetico capillare differente, si è resa necessaria la verifica delle taglie alleliche dei microsatelliti scelti. Tale verifica ha permesso di marcare nuovamente i primer sfruttando anche il quarto fluorocromo. Al fine di determinare correttamente il range di amplificazione dei diversi marcatori sono stati analizzati 96 campioni di DNA estratto da sangue di arieti provenienti dal 'Centro arieti della razza Sarda'.

In seguito alla verifica delle rispettive taglie di amplificazione il passo successivo è stato quello di attribuire una marcatura fluorescente a ciascun primer, che differisse da quella attribuita ai primer con similarità e talvolta stesso range del prodotto di amplificazione, sfruttando le 4 marcature fluorescenti disponibili con l'ABI PRISM® 3130 : Pet, 6 Fam, Vic e Ned.

Di conseguenza è stata studiata la miglior strategia per organizzare in multiplex o multiloading l'analisi di tutti i microsatelliti scelti.

Le multiplex-PCR ottenute, messe a punto su DNA estratto da sangue, sono state quindi utilizzate sul DNA estratto dalle cellule somatiche del latte ovino dei 36 campioni, sia di quello refrigerato per l'intera giornata a 4°C che di quello precedentemente congelato a -20°C..

Le condizioni analitiche utilizzate sono state le seguenti:

Per un volume finale di 20µl le reazioni di PCR sono state impiegate le seguenti condizioni di amplificazione:

✚ 30-50 ng di DNA,

✚ 1 X PCR Buffer (KCl 50 mM, TrisHCl 10 mM pH=8.3),

- ✚ 1.5 mM MgCl₂,
- ✚ 200 μM dNTPs,
- ✚ 0.5 U Taq Polymerase
- ✚ 0.5 μM per ciascun primer
- ✚ H₂O a volume.

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati denaturati per 3' a 95°C e posti in ghiaccio prima di essere sottoposti a corsa elettroforetica.

La corsa elettroforetica è stata effettuata con un capillare in silice da 36 cm caricato con un polimero di separazione ottimizzato (POP-4™) aggiungendo, per ogni singolo campione amplificato, un opportuno marcatore di peso molecolare noto (Genescan-Liz 500).

I reagenti utilizzati per la corsa elettroforetica al sequenziatore sono stati i seguenti:

1. 3130 Performance Optimized Polymer 4: POP-4™
2. 3130 Genetic Analyzer 10x Running Buffer con EDTA
3. HI-DI formammide
4. Genescan-Liz-500 size standard

I dati ottenuti sono stati in seguito elaborati (Figura 5.3) con il software Genemapper™ (Applied Biosystems).

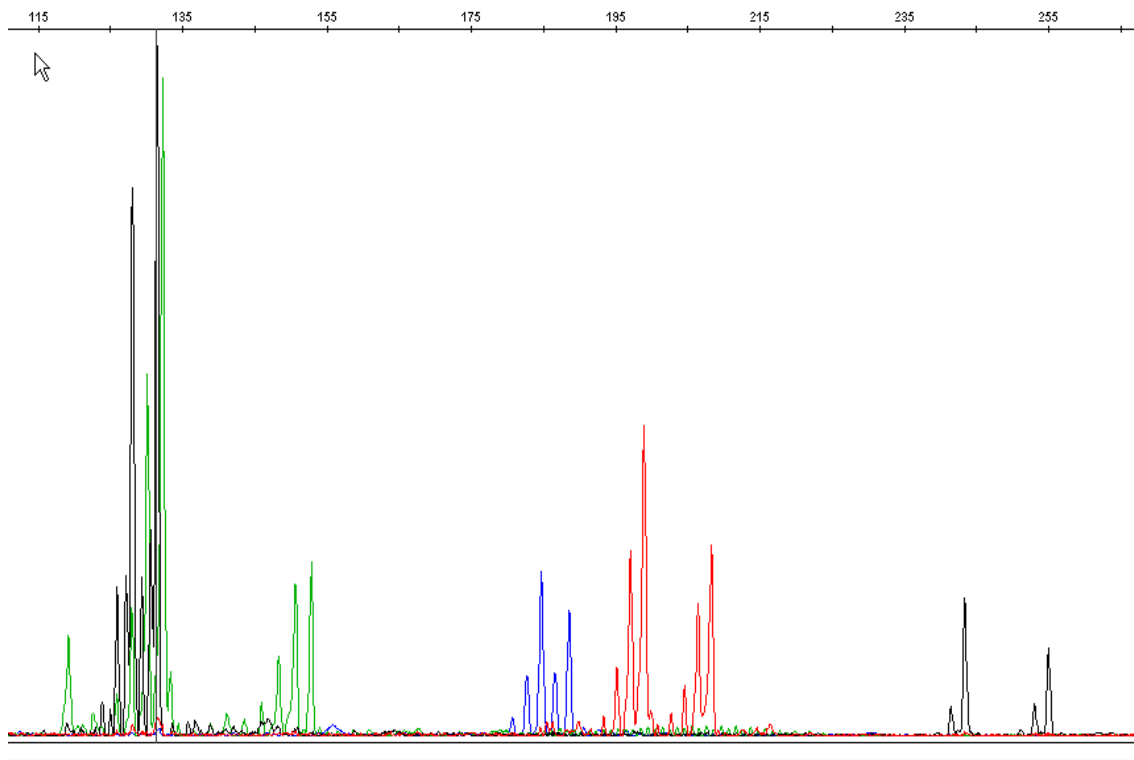


Figura 5.3 Rappresentazione della 5-PLEX analizzata con Genemapper™ (Applied Biosystems). I 5 microsatelliti sono stati marcati con i 4 fluorocromi disponibili: 1 Vic (Verde), 1 Fam (Blu), 1 Pet (Rosso) e 2 Ned (Giallo).

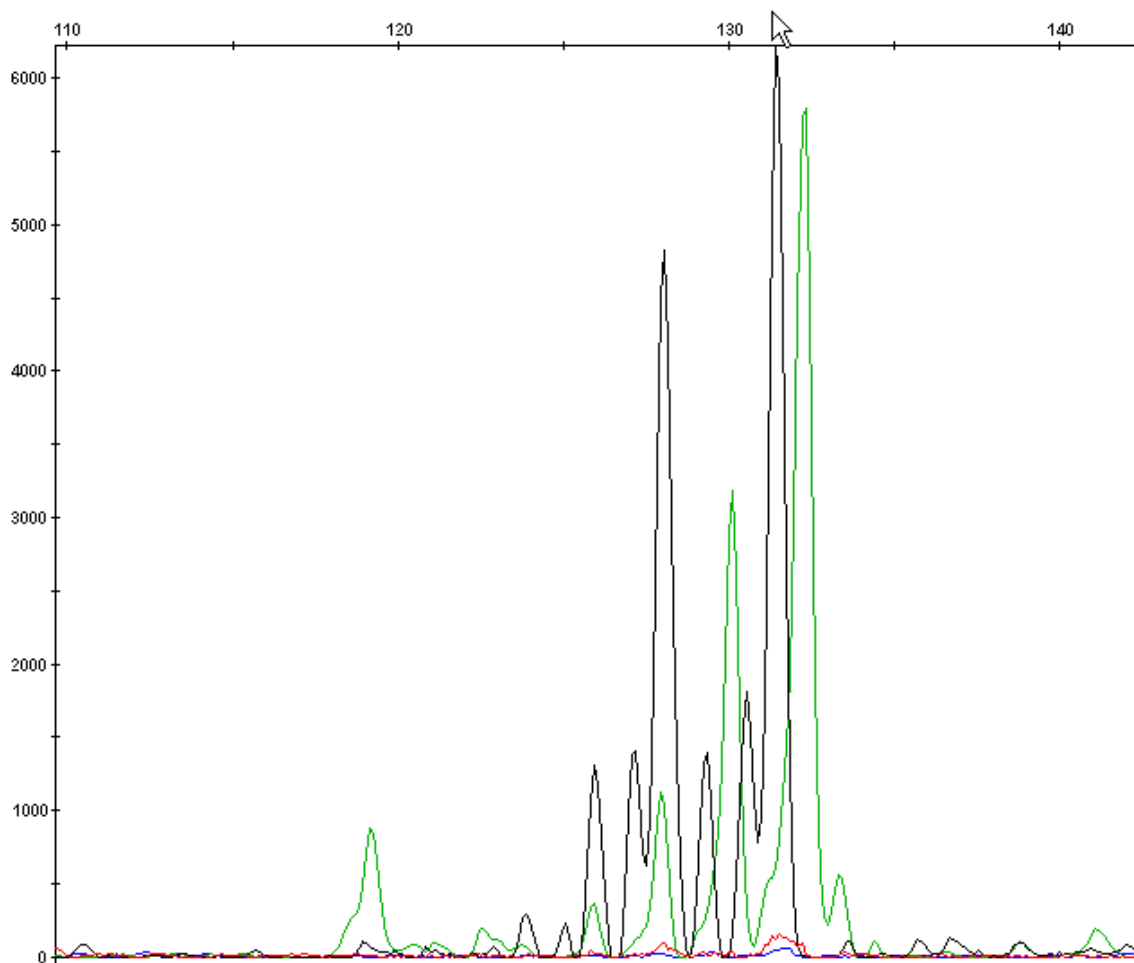


Figura 5.4 Dettaglio della **Figura 5.3**. che mette in evidenza 2 microsattelliti che presentano taglia allelica sovrapposta e che di conseguenza sono stati marcati con 2 diversi fluorocromi. (Ned e Vic).

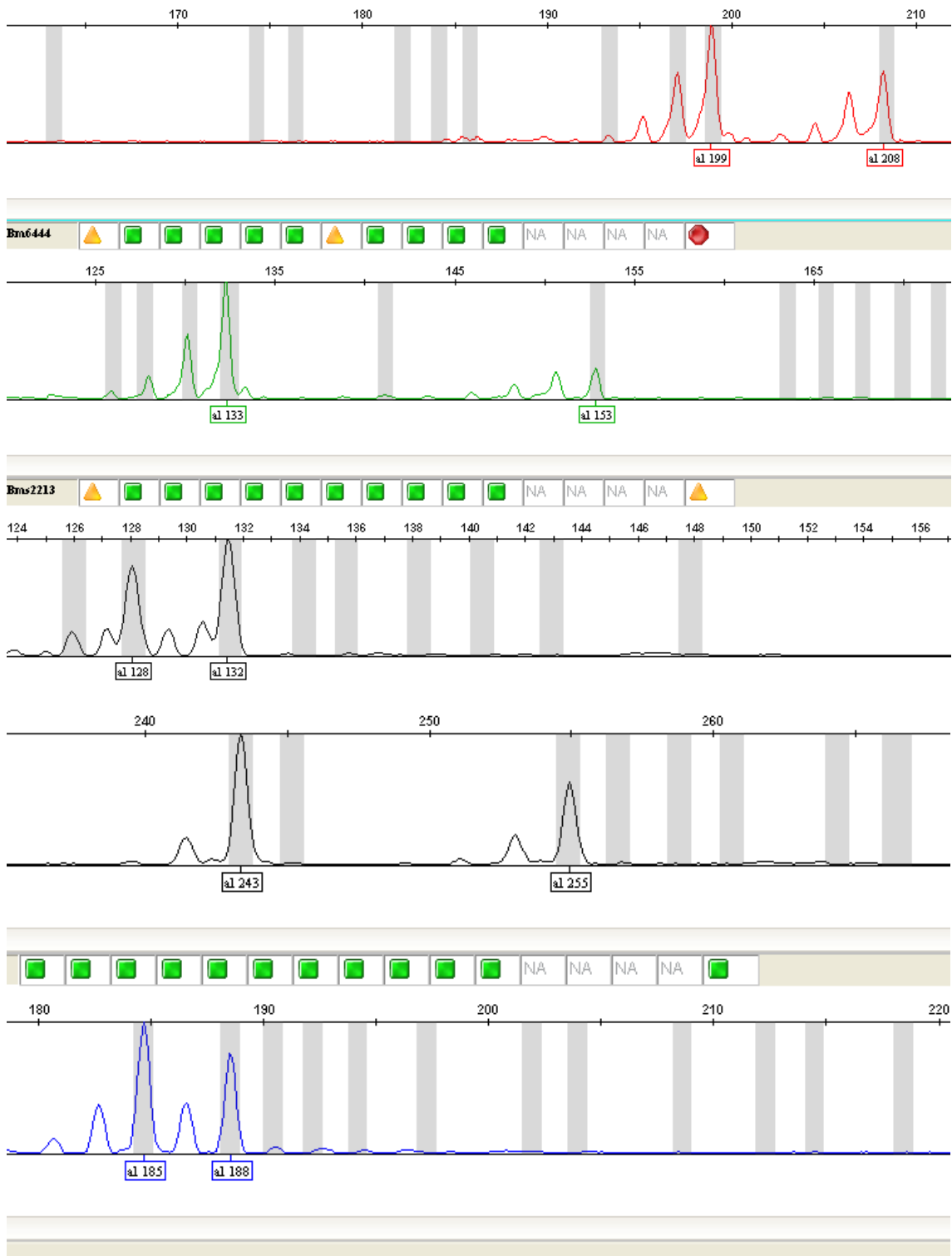


Figura 5.5 Esempio di analisi per l'attribuzione delle taglie alleliche utilizzando il software Genemapper™ (Applied Biosystems).

5.4.2 Stima della probabilità di attribuzione della paternità

Una volta identificati i microsattelliti più informativi e stabilite le loro condizioni di elaborazione analitica si è valutata la possibilità di utilizzarli per la verifica e l'attribuzione delle paternità.

Per ogni microsattellite, a partire dalle frequenze alleliche stimate nella razza Sarda, è stata calcolata la probabilità di esclusione della paternità applicando la formula di Jamienson e Taylor,(1997), che fornisce tale probabilità nel caso in cui solo il genotipo di un genitore sia disponibile:

$$P = 1 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^2 + 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^3 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^2$$

In seguito, la potenza del set di marcatori scelto (e delle loro eventuali combinazioni) per l'attribuzione delle paternità è stata determinata attraverso delle simulazioni. E' stato simulato il genotipo a 10 microsattelliti non-linked di una popolazione di 1000 pecore figlie di 10 padri non parenti, utilizzando le frequenze alleliche stimate. Per ciascuna figlia simulata è stata quindi eseguita l'attribuzione delle paternità, considerando ignoto il genotipo delle madri. Inizialmente si è proceduto, per ogni marcatore considerato, a verificare la compatibilità di ciascuna figlia con il genotipo dei possibili 10 padri, quindi si è calcolata la percentuale di attribuzioni di paternità univoche che era possibile ottenere considerando i diversi marcatori, inclusi in ordine di informatività o sulla base della loro combinazione in multiplex.

6. RISULTATI

6 Risultati

6.1 Il latte come matrice biologica:

Il latte, trattato e non con il conservante Bronopol e trasportato a temperatura ambiente presso il laboratorio di analisi, ha mantenuto pressoché inalterate le sue caratteristiche. Ai fini dell'applicazione dei diversi protocolli di estrazione del DNA non sono state riscontrate sostanziali differenze nel manipolare il latte semplicemente refrigerato da quello precedentemente congelato e poi scongelato. Diverso è stato invece il caso nel trattare il latte ovino da quello caprino, a causa della maggior presenza di grasso del primo.

La presenza del grasso infatti interferisce nei passaggi di estrazione, anche se la sua rimozione totale resta praticamente impossibile. Per ovviare almeno in parte a tale problema sono state effettuate, per tutte le metodiche applicate, lunghe centrifugate della durata di almeno 30', alla velocità di 3000 rpm e alla temperatura di 4°C (Amills *et al.*,1997). Questo ha facilitato la stratificazione della frazione fosfolipidica/trigliceridica in superficie, rendendo all'operatore più agevole la sua rimozione manuale.

Un passaggio successivo alla centrifugazione è stato quello di tenere qualche minuto i campioni a -20°C. Il congelamento temporaneo ha infatti reso ancor più ben delimitato lo strato di grasso in superficie, indipendentemente dal tipo di conservazione cui era stato sottoposto in precedenza.

6.1.1 Scelta della metodica d'estrazione : esperimento 1

Della soluzione contenente il DNA dei 160 campioni di latte di capra estratti con la metodica rapida 1 una quantità pari a circa 50 ng sono stati utilizzati per la reazione di PCR utilizzando i microsatelliti STS011 e STS087 organizzati in multiplex.

I risultati ottenuti sono stati i seguenti:

- ✚ N°46 su 160 hanno amplificato per entrambi i microsatelliti.
- ✚ N°40 su 160 hanno amplificato solo per un microsatellite.
- ✚ N°20 su 160 hanno mostrato un'emissione di fluorescenza inferiore a 100 e quindi non erano analizzabili.
- ✚ N°54 su 160 non hanno amplificato.

In conclusione solo il 28,7% delle estrazioni ha consentito l'amplificazione di entrambi i microsatelliti. Le possibili cause di tali risultati negativi potevano essere riconducibili sia ad un'insufficiente quantità del DNA estratto o, all'opposto, ad un'eccessiva concentrazione nella mix di reazione di PCR.

Un altro possibile fattore inibente l'amplificazione poteva essere riconducibile ad una soluzione con un pH tendenzialmente acido; condizione non adeguata al funzionamento della Taq Polimerasi. In effetti la determinazione del pH, realizzata con cartine Tornasole (Carlo Erba Reagenti), ha mostrato per tutti i campioni un pH inferiore a 4.

Per verificare l'ipotesi di un pH acido, quale possibile causa della non riuscita della reazione di PCR, si è proceduto alla correzione individuale dello stesso per ciascun campione, aggiungendo una soluzione basica per riportare il pH ad un valore quanto più prossimo alla neutralità.

In seguito alla correzione, altri 50 ng di DNA, di 16 campioni, presi a caso per testare tale modifica, sono stati utilizzati per la reazione di PCR utilizzando i microsatelliti sopracitati

Inoltre è stata realizzata l'amplificazione di un ulteriore microsatellite, il MAF65 appartenente allo stesso panel.

La correzione del pH ha consentito l'amplificazione del DNA di tutti i campioni analizzati. Ciò ha indicato che il protocollo di estrazione basato sulla metodica rapida 1 consentiva di ottenere una quantità di DNA sufficiente per le analisi molecolari, ma produceva una soluzione con un pH eccessivamente acido per il funzionamento della Taq Polimerasi e per una corretta amplificazione.

Poiché la correzione del pH per ciascun campione sarebbe inapplicabile in un protocollo d'estrazione per le analisi da effettuare in routine, è stato necessario apportare alcune modifiche alla metodica rapida 1.

Le modifiche apportate sono state la sostituzione della soluzione di lavaggio NE con il PBS, al fine di contribuire a mantenere costante il pH della soluzione, e l'aggiunta di una quantità doppia del mix Tris-HCl 100mM/HCl 200mM, addizionandone 100µl. anziché 50µl. Tali modifiche hanno condotto alla messa a punto della metodica di estrazione rapida 2.

6.1.2 Scelta della metodica d'estrazione : esperimento 2

Nella Tabella 6.1 sono mostrati i valori del pH della soluzione contenente il DNA estratto con la metodica rapida 2 dai 36 campioni di latte ovino fresco (Tabella 5.2).

Il pH dei campioni presentavano valori vicini alla neutralità, senza variazioni significative rispetto a quelli del latte di partenza.

Solo i campioni estratti da latte con elevato CCS (33 e 35 vedi Tabella .5.2), che presentavano un più basso tenore in grasso e una più alta percentuale di proteine totali, mantenevano un pH tendenzialmente acido.

| n. campione | pH latte | pH DNA | n. campione | pH latte | pH DNA |
|-------------|----------|--------|-------------|----------|--------|
| 1 | 6,6 | 6,4 | 19 | 6,6 | 6,7 |
| 2 | 6,4 | 6,7 | 20 | 6,5 | 6,4 |
| 3 | 6,5 | 6,5 | 21 | 6,8 | 7,0 |
| 4 | 6,7 | 6,7 | 22 | 6,7 | 6,0 |
| 5 | 6,5 | 6,6 | 23 | 6,4 | 6,6 |
| 6 | 6,5 | 6,5 | 24 | 6,4 | 6,5 |
| 7 | 6,4 | 6,5 | 25 | 6,2 | 6,4 |
| 8 | 6,5 | 6,6 | 26 | 6,6 | 6,7 |
| 9 | 6,3 | 6,4 | 27 | 6,6 | 7,0 |
| 10 | 6,7 | 6,7 | 28 | 6,6 | 7,0 |
| 11 | 7,0 | 7,0 | 29 | 6,4 | 6,0 |
| 12 | 6,7 | 6,6 | 30 | 6,7 | 7,0 |
| 13 | 6,6 | 6,7 | 31 | 6,8 | 6,7 |
| 14 | 6,5 | 6,4 | 32 | 6,5 | 6,6 |
| 15 | 6,8 | 6,7 | 33 | 5,8 | 5,5 |
| 16 | 6,7 | 6,7 | 34 | 6,5 | 7,0 |
| 17 | 6,7 | 6,6 | 35 | 5,7 | 5,4 |
| 18 | 6,6 | 6,5 | 36 | 6,0 | 7,0 |

Tabella 6.1 Identificativo del campione di latte ovino, pH del latte, pH DNA estratto con la metodica rapida 2.

Gli accorgimenti apportati alla metodica rapida 1 per riequilibrare il pH hanno quindi permesso di riportare la soluzione di estrazione vicina alla neutralità.

6.1.2.1 *Quantificazione elettroforetica su gel d'agarosio*

In seguito a corsa elettroforetica, effettuata su di un gel d'agarosio preparato allo 0,8%, è stato possibile visualizzare solo le bande del DNA dei 26 campioni di latte precedentemente congelati ed estratti utilizzando il kit commerciale (NucleoSpin Food).

La migrazione delle stesse è avvenuta in corrispondenza del marker-DNA di taglia molecolare nota pari a circa 150 ng.

Lipkin *et al.*, (1993) con una metodica salina, che prevede l'utilizzo della proteinasi k, da un volume iniziale di 25 o 50 ml rispettivamente di latte bovino, ha ottenuto, in seguito ad una corsa elettroforetica su gel d'agarosio, colorato con Bromuro d'Etidio, bande di DNA, precedentemente digerite con un enzima di restrizione, comprese tra 11 µg e 1101 µg.

Nei campioni estratti con la metodica rapida 2 non si è osservata nessuna migrazione delle bande; questo stesso risultato è stato ottenuto in seguito anche con la semina del DNA, estratto applicando la medesima metodica rapida, sia da sangue che da bulbo pilifero.

Probabilmente tale fenomeno è la conseguenza di una eccessiva degradazione del DNA in seguito al trattamento subito con la metodica rapida alcalina.

6.1.2.2 *Quantificazione spettrofotometrica con il NanoDrop*

Le Tabelle 6.2 - 6.3 e 6.4 mostrano i risultati delle letture fatte al NanoDrop ND-1000 del DNA estratto con la metodica rapida 2 da latte refrigerato e da quello precedentemente congelato e di quello estratto con il kit commerciale usato per comparazione.

L'acido nucleico viene rilevato alla lunghezza d'onda di 260nm, e la concentrazione del DNA viene espressa in ng/ μ l.

L'assorbanza a 280nm indica la presenza di proteine, mentre sostanze di natura diversa da quella proteica assorbono ad una lunghezza d'onda di 230nm.

Conoscere il valore dei rispettivi rapporti A 260/280 e A 260/230 fornisce indicazioni relative del grado di purezza del DNA.

Il valore ottimale del rapporto di Assorbanza 260nm/280nm compreso tra 1,6 e 1,8 indica un buon grado di purezza del DNA da contaminazione di natura proteica, anche se una variazione dello stesso valore di 0,2 - 0,4 può dipendere anche da oscillazioni del pH della soluzione contenente il DNA, William,(1997)

Il rapporto A 260nm/230nm individua sostanze contaminanti di natura non proteica che solitamente riguardano residui di HCL o di altri reagenti utilizzati per l'estrazione, tale valore in condizioni ottimali dovrebbe essere compreso tra 2 e 2,2.

6.1.2.3 *Quantità di DNA estratto*

I 36 campioni estratti da latte fresco hanno mostrato concentrazioni di DNA comprese tra 34,13 ng/ μ l e 349,46 ng/ μ l, mentre il range di concentrazione di quelli precedentemente congelati è risultato compreso tra 61,3 ng/ μ l e 503,1 ng/ μ l. Il range di concentrazione del DNA dei n°26 campioni estratti con il kit NucleoSpin Food è risultato invece compreso tra 7,07 ng/ μ l e 99,28 ng/ μ l. D'Angelo *et al.*,(2007), applicando la metodica salina su 40 ml di latte caprino hanno ottenuto concentrazioni del DNA comprese tra 2,12 μ g / μ l e 610,12 μ g

/ μ l, mentre Murphy *et al.*,(2002), con un metodo di estrazione che prevede l'uso della proteinasi k, riportano, da 50ml di latte bovino, una concentrazione di 10ng/ μ l e 200 ng/ μ l.

| n. campione | Concentrazione DNA ng/μl | Assorbanza DNA 260 | Assorbanza proteine 280 | Assorbanza rapporto 260/280 | Assorbanza rapporto 260/230 |
|-------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | 85,17 | 1,703 | 1,104 | 1,54 | 0,41 |
| 2 | 57,08 | 1,141 | 0,729 | 1,57 | 0,48 |
| 3 | 140,66 | 2,813 | 1,740 | 1,62 | 0,60 |
| 4 | 101,46 | 2,029 | 1,276 | 1,59 | 0,64 |
| 5 | 101,53 | 2,031 | 1,412 | 1,44 | 0,39 |
| 6 | 234,58 | 4,692 | 3,136 | 1,50 | 0,59 |
| 7 | 103,68 | 2,074 | 1,399 | 1,48 | 0,59 |
| 8 | 349,46 | 6,989 | 4,406 | 1,59 | 0,65 |
| 9 | 109,77 | 2,195 | 1,919 | 1,14 | 0,32 |
| 10 | 326,23 | 6,525 | 4,389 | 1,49 | 0,65 |
| 11 | 53,89 | 1,078 | 0,775 | 1,39 | 0,43 |
| 12 | 62,10 | 1,242 | 0,768 | 1,62 | 0,56 |
| 13 | 92,67 | 1,853 | 1,411 | 1,31 | 0,53 |
| 14 | 342,30 | 6,846 | 4,843 | 1,41 | 0,86 |
| 15 | 57,28 | 1,146 | 0,722 | 1,59 | 0,62 |
| 16 | 263,46 | 5,269 | 4,877 | 1,08 | 0,91 |
| 17 | 34,13 | 0,683 | 0,611 | 1,12 | 0,15 |
| 18 | 152,02 | 3,040 | 2,151 | 1,41 | 0,47 |
| 19 | 209,59 | 4,192 | 2,709 | 1,55 | 0,59 |
| 20 | 66,11 | 1,322 | 0,944 | 1,40 | 0,45 |
| 21 | 129,93 | 2,599 | 1,679 | 1,55 | 0,60 |
| 22 | 140,78 | 2,816 | 1,957 | 1,44 | 0,44 |
| 23 | 153,96 | 3,079 | 2,049 | 1,50 | 0,53 |
| 24 | 40,40 | 0,808 | 0,444 | 1,82 | 0,45 |
| 25 | 105,49 | 2,110 | 1,618 | 1,30 | 0,34 |
| 26 | 93,71 | 1,874 | 1,256 | 1,49 | 0,44 |
| 27 | 223,81 | 4,476 | 2,965 | 1,51 | 0,58 |
| 28 | 124,05 | 2,481 | 1,825 | 1,36 | 0,37 |
| 29 | 47,21 | 0,944 | 0,684 | 1,38 | 0,33 |
| 30 | 230,03 | 4,601 | 2,939 | 1,57 | 0,57 |
| 31 | 327,31 | 6,546 | 4,932 | 1,33 | 0,67 |
| 32 | 74,57 | 1,491 | 1,316 | 1,13 | 0,36 |
| 33 | 104,50 | 2,090 | 1,439 | 1,45 | 0,41 |
| 34 | 77,08 | 1,542 | 1,156 | 1,33 | 0,45 |
| 35 | 168,89 | 3,378 | 2,091 | 1,62 | 0,60 |
| 36 | 168,89 | 3,378 | 2,091 | 1,62 | 0,60 |

Tabella 6.2 Identificativo del campione di latte ovino e concentrazione del DNA estratto dal latte refrigerato con la metodica rapida.

| n.campione | Concentrazione DNA ng/μl | Assorbanza DNA 260 | Assorbanza proteine 280 | Assorbanza rapporto 260/280 | Assorbanza rapporto 260/230 |
|------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 184,7 | 3,694 | 2,640 | 1,40 | 0,45 |
| 2 | 61,3 | 1,225 | 0,822 | 1,49 | 0,41 |
| 3 | 215,8 | 4,315 | 2,764 | 1,56 | 0,56 |
| 4 | 164,3 | 3,285 | 2,141 | 1,53 | 0,61 |
| 5 | 313 | 6,259 | 5,953 | 1,05 | 0,23 |
| 6 | 418,2 | 8,365 | 5,996 | 1,40 | 0,47 |
| 7 | 99,6 | 1,991 | 1,249 | 1,59 | 0,50 |
| 8 | 503,1 | 10,062 | 6,529 | 1,54 | 0,54 |
| 9 | 155,5 | 3,110 | 2,798 | 1,11 | 0,27 |
| 10 | 397,8 | 7,956 | 5,544 | 1,43 | 0,54 |
| 11 | 83,5 | 1,671 | 1,254 | 1,33 | 0,43 |
| 12 | 99,9 | 1,999 | 1,288 | 1,55 | 0,57 |
| 13 | 77,4 | 1,549 | 1,072 | 1,44 | 0,51 |
| 14 | 114,6 | 2,293 | 1,488 | 1,54 | 0,52 |
| 15 | 88,0 | 1,760 | 1,134 | 1,55 | 0,60 |
| 16 | 138,1 | 2,762 | 1,758 | 1,57 | 0,73 |
| 17 | 198,7 | 3,974 | 3,650 | 1,09 | 0,34 |
| 18 | 118,5 | 2,370 | 1,714 | 1,38 | 0,37 |
| 19 | 271,5 | 5,430 | 3,500 | 1,55 | 0,54 |
| 20 | 127,9 | 2,558 | 2,024 | 1,26 | 0,51 |
| 21 | 190,5 | 3,810 | 2,435 | 1,57 | 0,56 |
| 22 | 201,3 | 4,026 | 2,823 | 1,43 | 0,40 |
| 23 | 208,6 | 4,172 | 2,856 | 1,46 | 0,43 |
| 24 | 98,9 | 1,978 | 1,260 | 1,57 | 0,53 |
| 25 | 165,7 | 3,315 | 2,554 | 1,30 | 0,32 |
| 26 | 157,9 | 3,159 | 2,157 | 1,46 | 0,43 |
| 27 | 407,1 | 8,143 | 5,378 | 1,51 | 0,51 |
| 28 | 327,6 | 6,552 | 4,432 | 1,48 | 0,53 |
| 29 | 188,5 | 3,771 | 2,818 | 1,34 | 0,34 |
| 30 | 105,0 | 2,099 | 1,546 | 1,36 | 0,39 |
| 31 | 339,0 | 6,781 | 4,415 | 1,54 | 0,51 |
| 32 | 203,8 | 4,077 | 2,978 | 1,37 | 0,39 |
| 33 | 105,9 | 2,119 | 1,891 | 1,12 | 0,36 |
| 34 | 135,1 | 2,702 | 1,956 | 1,38 | 0,35 |
| 35 | 129,5 | 2,591 | 1,963 | 1,32 | 0,46 |
| 36 | 321,2 | 6,423 | 4,241 | 1,51 | 0,61 |

Tabella 6.3 Identificativo del campione di latte ovino e concentrazione del DNA estratto dal latte precedentemente congelato.

| n.campione | Concentrazione DNAng/ul | Assorbanza DNA 260 | Assorbanza proteine 280 | Assorbanza rapporto 260/280 | Assorbanza rapporto 260/230 |
|------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | 25,81 | 0,516 | 0,289 | 1,79 | 0,61 |
| 2 | 70,51 | 1,410 | 1,181 | 1,19 | 0,29 |
| 3 | 45,05 | 0,901 | 0,637 | 1,41 | 0,39 |
| 4 | 52,94 | 1,059 | 0,754 | 1,40 | 0,49 |
| 5 | 48,77 | 0,975 | 0,694 | 1,41 | 0,41 |
| 6 | 54,88 | 1,098 | 0,789 | 1,39 | 0,40 |
| 7 | 51,83 | 1,037 | 0,842 | 1,23 | 0,29 |
| 8 | 42,44 | 0,849 | 0,552 | 1,54 | 0,42 |
| 9 | 13,62 | 0,272 | 0,177 | 1,54 | 0,41 |
| 10 | 40,73 | 0,815 | 0,502 | 1,62 | 0,50 |
| 11 | 27,82 | 0,556 | 0,317 | 1,75 | 0,48 |
| 12 | 20,38 | 0,408 | 0,255 | 1,60 | 0,40 |
| 13 | 13,75 | 0,275 | 0,174 | 1,58 | 0,33 |
| 14 | 25,79 | 0,516 | 0,344 | 1,50 | 0,41 |
| 15 | 37,67 | 0,753 | 0,446 | 1,69 | 0,61 |
| 16 | 43,44 | 0,869 | 0,542 | 1,60 | 0,54 |
| 17 | 99,28 | 1,986 | 1,106 | 1,80 | 1,07 |
| 18 | 91,22 | 1,824 | 1,032 | 1,77 | 1,00 |
| 19 | 17,15 | 0,343 | 0,185 | 1,85 | 1,23 |
| 20 | 22,35 | 0,447 | 0,363 | 1,23 | 0,31 |
| 21 | 22,10 | 0,442 | 0,270 | 1,64 | 0,59 |
| 22 | 26,98 | 0,540 | 0,417 | 1,29 | 0,36 |
| 23 | 7,07 | 0,141 | 0,150 | 0,95 | 0,23 |
| 24 | 16,85 | 0,337 | 0,255 | 1,32 | 0,32 |
| 27 | 13,61 | 0,272 | 0,207 | 1,32 | 0,35 |
| 33 | 22,44 | 0,449 | 0,291 | 1,54 | 0,65 |

Tabella 6.4 Identificativo del campione di latte ovino e concentrazione del DNA estratto con il kit NucleoSpin Food (Macherey-Nagel) dal latte congelato.

La quantità di DNA, estratto sia con la metodica rapida che con il kit, non ha mostrato nessuna correlazione significativa con i parametri qualitativi del campione di latte di partenza (tenore in grasso, tenore in proteine totali, contenuto in cellule somatiche o pH del latte). I campioni n°33 e n°35 che presentavano un elevato CCS hanno fornito una quantità inferiore di DNA rispetto a quella ottenuta da campioni con valori di CCS più bassi. Probabilmente

tale risultato è causato dall'elevata percentuale di proteine totali presenti, che possono aver interferito nelle fasi di estrazione del DNA, o dal pH del latte di partenza, leggermente acido. Considerati i volumi iniziali di latte utilizzati (20 ml per l'estrazione rapida e 15 ml per quella da kit commerciale) e i valori medi di concentrazioni stabilite su questi (Tabella 6.5), la quantità di DNA che è stato possibile estrarre dagli stessi campioni di latte con la metodica rapida è stata 2,9 (partendo da latte refrigerato) 4 volte (partendo da latte congelato) superiore a quella ottenuta con l'estrazione da kit.

| Metodo | n. | DNA ng/ul | A260/280 | A260/230 |
|------------------------------------|-----------|------------------|-----------------|-----------------|
| Rapida da latte refrigerato | 36 | 143,16± 90,46 | 1,45± 0,16 | 0,52± 0,15 |
| Rapida da latte congelato | 36 | 197,69± 111,77 | 1,42± 0,15 | 0,47± 0,11 |
| KIT | 26 | 36,71± 23,42 | 1,50± 0,22 | 0,50± 0,25 |

Tabella 6.5 Medie ± deviazioni standard della concentrazione del DNA e dei rapporti di assorbanza dei campioni estratti con la metodica rapida 2 (da latte refrigerato e congelato) e con il kit Nucleospin analizzati al NanoDrop.

6.1.2.4 Valutazione dei rapporti 260nm/280nm e 260/230

Il valore del rapporto DNA/Proteine (rapporto di assorbanza 260/280) per i campioni estratti con il kit è leggermente più alto rispetto agli stessi estratti con la rapida 2. Valori inferiori a quelli ottimali del rapporto DNA/proteine erano attesi con la metodica rapida 2, in quanto essa non prevede l'impiego né di proteinasi k né di altri reagenti mirati alla purificazione e

all'eliminazione di eccessi proteici. Le proteine sono considerate tra le maggiori cause responsabili della mancata amplificazione nelle reazioni di PCR. Nelle metodiche saline utilizzate (D'Angelo *et al.*,2007; Lipkin *et al.*,1993; Ernst e Dentine,1992) la loro eliminazione avviene con l'aggiunta di elevate concentrazioni di NaCl e della proteinasi k durante l'incubazione. Rudbeck e Dissing,(1998) sostengono che nella metodica rapida circa l'85% delle proteine viene eliminata aggiungendo l'NaOH e sottoponendo i campioni a prolungata incubazione, 2h a 65°C. La somiglianza del rapporto di assorbanza 260/280 con i valori ottenuti dall'estrazione con kit, suggerisce che, nell'estrazione rapida, le contaminazioni proteiche residue non dovrebbero compromettere le successive analisi molecolari.

Per quanto concerne i rapporti di assorbanza a 260nm e 230 nm, sia i campioni estratti con la metodica rapida che quelli estratti con il kit presentano valori molto lontani da quelli considerati ottimali.

Simili valori indicano la presenza di sostanze contaminanti non proteiche, che nel nostro caso potrebbero dipendere dai residui del conservante Bronopol utilizzato per la conservazione del latte stesso.

6.1.2.4.1 Analisi molecolari

Per tutti i campioni estratti con la metodica rapida 2 è stato possibile determinare il genotipo al locus PrP mediante Real Time PCR.

Come verrà mostrato nel paragrafo 6.2.3 inoltre, è stato possibile procedere, per tutti i campioni estratti, all'amplificazione dei microsatelliti scelti per l'attribuzione delle paternità negli ovini di razza Sarda.

In conclusione la quantità di DNA ottenuta dalle cellule somatiche del latte con la metodica rapida modificata è risultata sufficiente per le successive analisi molecolari cui i campioni sono stati sottoposti.

6.2 Messa a punto di un sistema per l'attribuzione della paternità negli ovini di razza Sarda

6.2.1 Descrizione del panel di marcatori disponibili e scelta dei microsatelliti più informativi

Tra i 145 microsatelliti del panel Genesheepsafety il numero medio di alleli identificati nella razza Sarda è risultato 9.93 (min2 e max 34) e l'eterozigosità attesa (H_e) è risultata compresa tra 0.38 e 0.93. Il panel di microsatelliti era sufficientemente informativo. Infatti, 25 microsatelliti presentavano un numero di alleli effettivi superiore o uguale a 7 (Figura 6.1).

Nella popolazione sperimentale analizzata, per 27 combinazioni padre-marcatore, è stata riscontrata la presenza di diverse figlie omozigoti incompatibili con il genotipo del padre. Questa evidenza suggeriva che le figlie in questione non fossero in realtà omozigoti, ma avessero ricevuto l'allele nullo dal padre e che l'unico allele identificabile fosse quello ricevuto dalla madre. La frequenza degli alleli nulli, stimata per questi 27 marcatori, variava tra 0.0029 e 0.496, ma potrebbe essere sottostimata. Infatti l'eventuale presenza di un allele nullo non poteva essere rivelata qualora la figlia backcross fosse risultata omozigote, ma compatibile con il padre.

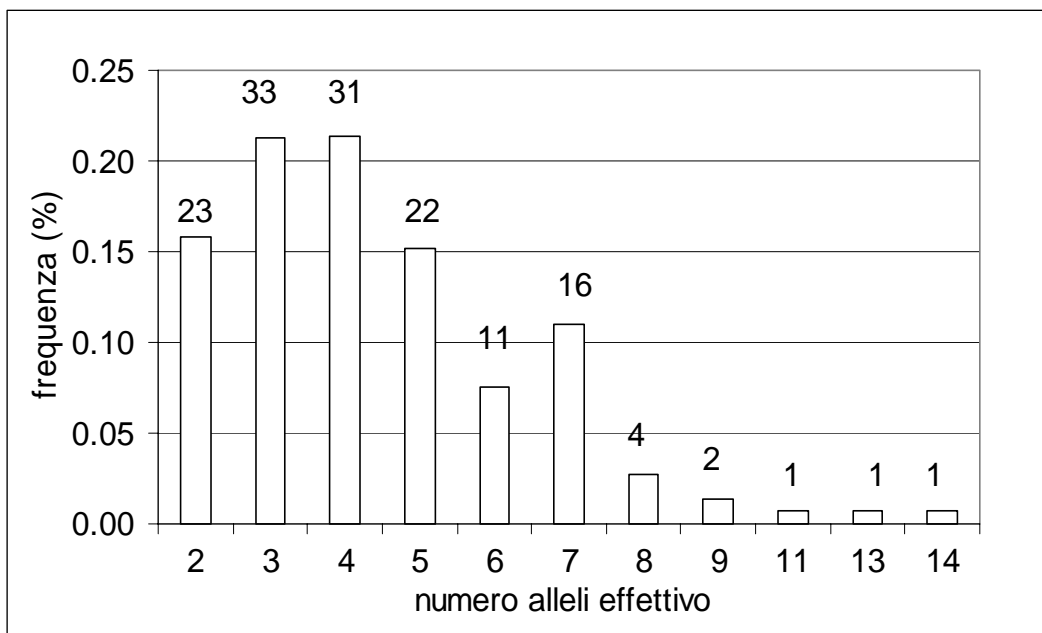


Figura 6.1 Frequenza e numero di microsatelliti del panel di “Genesheepsafety” in funzione del numero effettivo di alleli

La Tabella 6.6 mostra i 12 microsatelliti che, presentando il maggior numero di Ne e la più alta He, sono risultati i più informativi del panel. Tra questi BM203 e TGLA122 presentavano l’allele nullo. Nonostante la frequenza dell’allele nullo fosse bassa (0.000796 e 0.000032 rispettivamente), questi due microsatelliti sono stati esclusi dalla scelta per evitare erronee esclusioni di paternità. Dakin e Advise,(2004) hanno infatti dimostrato che la presenza di alleli nulli può portare a una sostanziale distorsione nella verifica delle paternità, portando ad escludere la compatibilità tra un padre e la sua vera figlia, qualora il genotipo di entrambi appaia omozigote per alleli diversi mentre entrambi sono eterozigoti e portatori dell’allele nullo.

| OAR | marcatore | n | Na | He | Ne | Pe |
|-----|----------------------|-----|----|------|-------|--------|
| 1 | MCM058 | 791 | 20 | 0,93 | 13,64 | 0,7400 |
| 1 | LSCV06 | 773 | 21 | 0,92 | 12,51 | 0,7216 |
| 10 | BMS2252 | 765 | 34 | 0,91 | 10,75 | 0,6898 |
| 2 | BM6444 | 780 | 14 | 0,89 | 9,11 | 0,6384 |
| 11 | MCM120 | 748 | 17 | 0,89 | 8,71 | 0,6242 |
| 26 | BM0203 ¹ | 620 | 17 | 0,87 | 7,93 | 0,6009 |
| 14 | BMS2213 | 857 | 11 | 0,87 | 7,89 | 0,5933 |
| 20 | OLADRBP | 728 | 15 | 0,87 | 7,54 | 0,5892 |
| 18 | TGLA122 ¹ | 702 | 14 | 0,87 | 7,52 | 0,5754 |
| 26 | CSSM43 | 596 | 14 | 0,87 | 7,45 | 0,5892 |
| 22 | MCM373 | 862 | 18 | 0,86 | 7,31 | 0,5823 |
| 6 | BMS0360 | 869 | 15 | 0,86 | 7,10 | 0,5625 |

¹ Microsatelliti con alleli nullo

Tabella 6.6 Sub-set composto dai 12 microsatelliti più informativi tra i 145 del panel del progetto “Genesheepsafety”; OAR=cromosoma ovino, n = numero di figlie con genotipo informativo, Na: numero di alleli veri; Ne numero alleli effettivi, He= eterozigosità attesa, Pe=probabilità di esclusione della paternità.

La messa a punto di un set di marcatori per l’attribuzione delle paternità negli ovini di razza Sarda si è quindi basata su 10 dei 12 marcatori (Tabella 6.6) più informativi che non presentavano l’allele nullo.

La probabilità di esclusione della paternità (Pe) di ogni microsatellite (Tabella 6.6) variava tra 0.74 e 0.56 e quella dei 10 microsatelliti nel loro complesso era pari a 0.99996, in genere considerata sufficiente per i comuni test di paternità basati sulle analisi del DNA (Vankan e Faddy,1999). Una probabilità di esclusione di paternità del 99% è stata ottenuta con 12 microsatelliti, organizzati in 2 multiplex, da Sereno *et al.*,(2008) nella razza Pantaneiro in Brasile. Ellegren *et al.*,(1992) ottengono tali valori di Pe con 10 microsatelli, mentre Marklundun *et al.*,(1994) raggiungono una probabilità di esclusione compresa tra 0,96 e 0,99

con 8 microsatelliti. Ivanovic *et al.*,(2004), Curi e Lopes(2002) raggiungono rispettivamente una $Pe=0,9991$, Cho,(2002) $0,9979$, Lee and Cho,(2006) $0,9998$ e Seyedabadi,(2006) una $Pe=0,973$, con soli 7 microsatelliti molto informativi

6.2.2 Organizzazione in multiplex

In seguito all'analisi del genotipo, effettuata sui 96 arieti di razza Sarda, si è potuto stabilire il range corretto del prodotto di amplificazione relativo a ciascun microsatellite (Figura 6.2), e cercare di attribuire le marcature fluorescenti che permettessero di discriminare i microsatelliti con taglia simili. Lo scopo finale era quello di combinare il maggior numero possibile di microsatelliti in un'unica reazione di amplificazione.

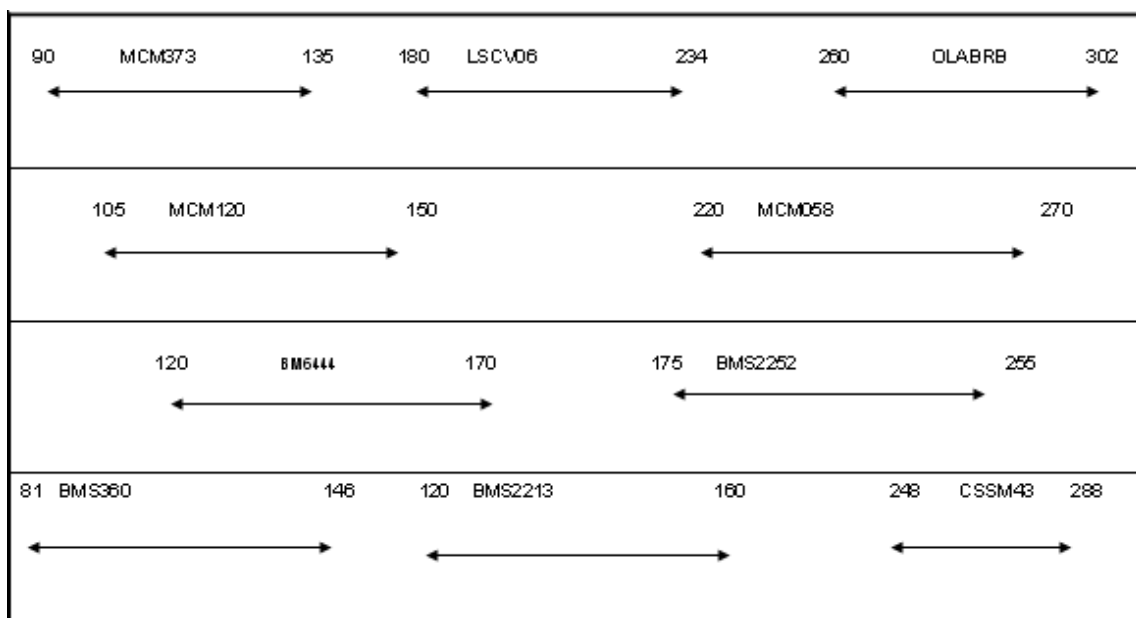


Figura 6.2 Range di amplificazione per ciascun microsatellite ottenuto sulla base dei genotipi di 96 arieti di razza Sarda

La Tabella 6.7. mostra le possibili marcature fluorescenti che era possibile applicare ai diversi microsatelliti.

| Microsatellite | Marcatura Fluorescente | Taglia | Temperatura di annealing |
|----------------|------------------------|-----------|--------------------------|
| MCM058 | Pet | 220 – 270 | 50°C |
| LSCV06 | 6Fam | 180 – 234 | |
| BM6444 | Vic | 120 – 170 | |
| BMS2213 | Ned | 120 – 170 | |
| CSSM43 | Ned | 248 – 288 | |
| BMS2252 | Ned-Vic | 175 – 255 | 52°C |
| MCM120 | Pet | 105 – 150 | |
| OLADRBP | 6Fam | 260 - 302 | |
| MCM373 | 6Fam | 90 – 135 | 50°C |
| BMS0360 | Ned-Vic | 81 – 146 | |

Tabella 6.7 Condizioni di amplificazione dei microsatelliti, temperature di annealing (Ta), effettive taglie dei prodotti e possibili marcature fluorescenti.

6.2.2.1 Opzione 1

La prima possibilità vagliata (Figura 6.3) prevedeva la combinazione di tutti e 10 i microsatelliti sistemati in 2 multiplex-PCR da 5, ciascuna organizzata tenendo in considerazione le condizioni di amplificazione dei rispettivi primer, rispettivamente la multiplex-PCR “A” e la multiplex-PCR “B”.

OPZIONE 1

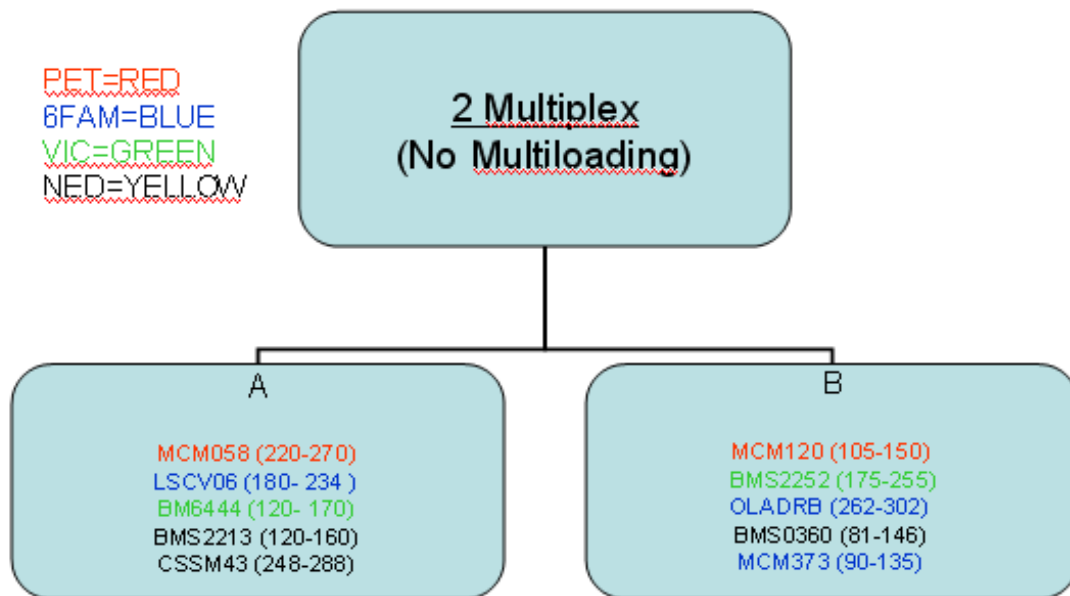


Figura 6.3 Opzione 1: un sistema di 2 multiplex-PCR con rispettive marcature fluorescenti attribuite a ciascun microsatellite.

Esaminando separatamente le 2 multiplex non si osserva nessuna sovrapposizione, tuttavia così organizzate non potevano essere processate al sequenziatore automatico in un'unica analisi (multiloads) per via delle sovrapposizioni alleliche tra il BMS2213 (multiplex A) e BMS360 (multiplex B). Peraltro, tra il BM6444 e il BMS2252, rispettivamente appartenenti alla multiplex "A" e alla "B" ma entrambi marcati con VIC, non veniva rispettata la distanza minima di 10bp necessaria per la discriminazione allelica.

Anche attribuendo una differente marcatura al BMS0360 (da NED a VIC), compatibile con il range dei prodotti di PCR dei microsatelliti presenti nella multiplex B, si avrebbe comunque una sovrapposizione con gli alleli del microsatellite BM6444, anch'esso VIC, della multiplex A.

6.2.2.2 Opzione 2:

La seconda possibilità considerata (Figura 6.4) presupponeva invece di poter effettuare un multiloading finale, rispettivamente di 8 su 10 microsatelliti, procedendo alla realizzazione di 2 multiplex-PCR, la A e la B, dalla quale però si escludevano il BMS0360 e l'MCM373.

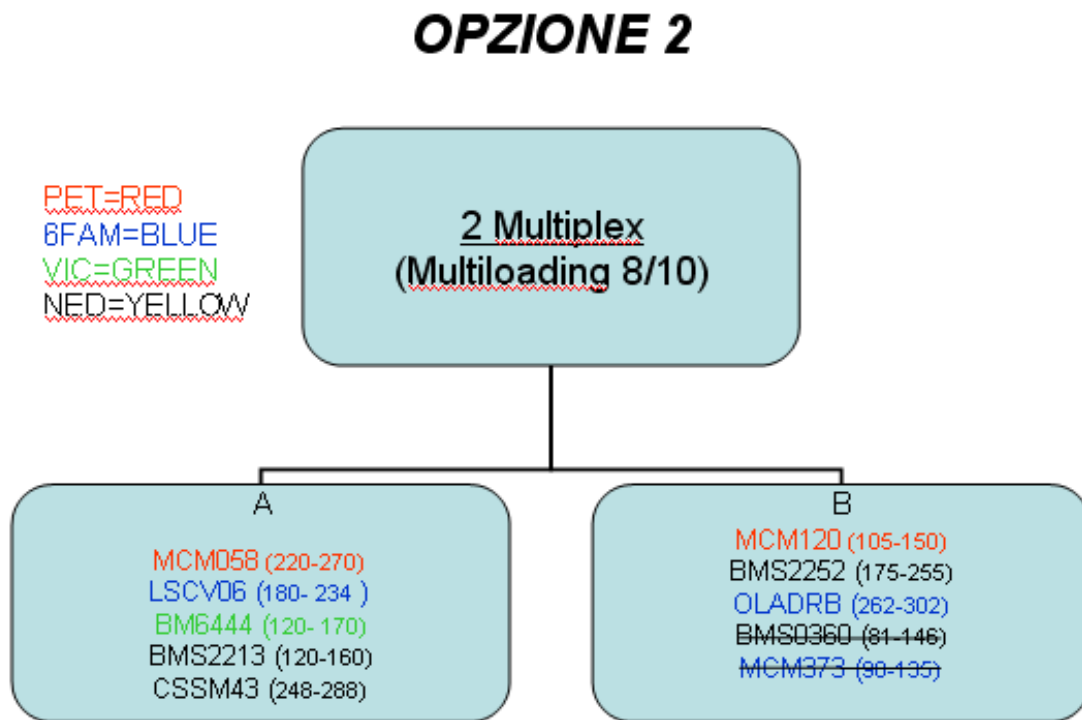


Figura 6.4 Opzione 2: un sistema di 2 multiplex-PCR con le rispettive marcature fluorescenti attribuite a ciascun microsatellite.

L'esclusione dei 2 microsatelliti per l'analisi finale in multiloading è stata presa in considerazione in quanto essi presentano il minor numero di Ne e la più bassa He (Tabella 6.6.), e quindi sono risultati essere quelli meno informativi del panel.

Inoltre l'esclusione di BMS0360 (NED) non crea sovrapposizioni alleliche con il BMS2213 (NED), come invece nell'opzione 1 (Figura 6.3).

Non solo, cambiando la marcatura al BMS2252, da VIC a NED, si rispetta la distanza minima tra 2 microsatelliti (BMS2252 e BM6444), superando la difficoltà dell'opzione 1.

6.2.2.3 Opzione 3

L'ultima opzione infine (Figura 6.5) ipotizzava la possibilità di poter effettuare un multiloading finale di 9 dei 10 microsatelliti

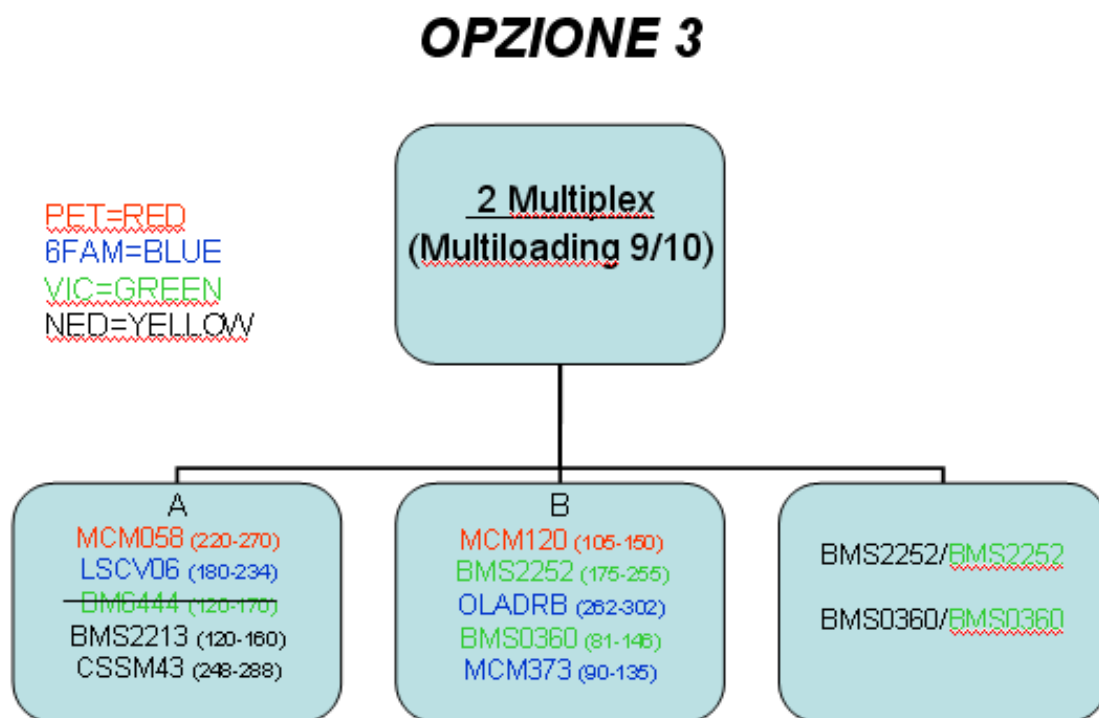


Figura 6.5 Opzione 3: un sistema di 2 multiplex-PCR con le rispettive marcature fluorescenti attribuite a ciascun microsatellite.

La realizzazione dell'opzione 3 prevedeva la messa a punto di un sistema di 2 multiplex-PCR che contemplava l'esclusione del BM6444 dalla multiplex A e una diversa marcatura (da NED a VIC) per il BMS2252 e del BMS360 della multiplex B.

Escludendo BM6444 (VIC) e marcando BMS360 di VIC non si ha sovrapposizione di taglia e si mantiene la distanza minima delle 10 bp con BMS2252, marcato anch'esso di VIC.

Alla luce delle considerazioni fatte si è quindi deciso di realizzare 3 sistemi di multiplex-PCR: rispettivamente la multiplex 1, costituita da 5 microsatelliti, la multiplex 2, da 3 microsatelliti e infine la multiplex 3 realizzata con la combinazione dei 2 microsatelliti meno informativi (Tabella 6.8).

| Multiplex | Microsatellite | Marcatura Fluorescente | Taglia | Temperatura di annealing |
|-----------|----------------|------------------------|-----------|--------------------------|
| 1 | MCM058 | Pet | 150 – 220 | 52°C |
| | LSCV06 | 6Fam | 166 – 230 | |
| | BM6444 | Vic | 110 – 180 | |
| | BMS2213 | Ned | 118 – 160 | |
| | CSSM43 | Ned | 226 – 274 | |
| 2 | BM2252 | Ned-Vic | 178 – 260 | 50°C |
| | MCM120 | Pet | 100 – 154 | |
| | OLADRBP | 6Fam | 250 - 298 | |
| 3 | MCM373 | 6Fam | 80 – 136 | 50°C |
| | BMS0360 | Ned-Vic | 60 – 136 | |

Tabella 6.8 Composizione delle tre multiplex finali, marcature fluorescenti dei microsatelliti, taglie effettive dei loro prodotti e temperature di annealing (Ta).

Benché i microsatelliti delle multiplex 2 e 3 non possano essere amplificati in un'unica reazione per la diversa temperatura di annealing, la scelta fatta consente di realizzare con 3

reazioni di multiplex-PCR, l'analisi in multiloading di 8 dei 10 microsatelliti scelti e di utilizzare gli ultimi 2 solo come supporto.

6.2.3 Applicazione delle multiplex al DNA estratto da cellule somatiche del latte

Della soluzione contenente il DNA dei 36 campioni di latte di ovino estratti con la metodica rapida 2 circa 50 ng, diluiti in H₂O sterile nel rapporto di 2:50, sono stati utilizzati per le 3 reazioni di multiplex-PCR che prevedevano l'assemblaggio dei 10 microsatelliti (Tabella 6.8).

I risultati ottenuti sono stati i seguenti:

- ✚ N°35 campioni su 36 hanno amplificato nella 5-PLEX, rispettivamente per tutti i microsatelliti.
- ✚ N°36 su 36 hanno amplificato per la 3-PLEX.
- ✚ N°36 su 36 per la 2-PLEX.

Tali risultati sono stati ottenuti nonostante la metodica applicata per l'estrazione del DNA dalle cellule somatiche del latte non comprendesse né l'utilizzo di un buffer di lisi in presenza di proteinasi K, né l'impiego di apposite colonnine di separazione.

L'amplificazione è andata a buon fine nonostante l'analisi eseguita al NanoDrop avesse riportato valori non ottimali del grado di purezza del DNA.

La metodica rapida di estrazione del DNA da cellule somatiche del latte, che comporta costi limitati e rapidità di esecuzione, si è quindi rivelata applicabile per l'analisi di microsatelliti.

6.2.4 *Potenza dei microsatelliti scelti per l'attribuzione della paternità*

La Tabella 6.9 mostra i risultati delle simulazioni eseguite e riporta la probabilità di corretta attribuzione delle paternità qualora venissero utilizzate le diverse multiplex ottenute. Le simulazioni hanno dimostrato anche il solo utilizzo dei microsatelliti della multiplex 1 consentiva di attribuire in maniera univoca un solo padre (tra i 10 possibili) al 98.2% delle figlie. Il rimanente 1.8% di attribuzioni non univoche, peraltro, riguardava animali che risultavano compatibili con soli due padri.

| Multiplex | Microsatellite | Percentuali di attribuzione di paternità univoca |
|------------------|---|---|
| 1 | MCM058 LSCV06 BM6444 BMS2213 CSSM43 | 0.982 |
| 2 | BMS2252 MCM120 OLADRBP | 0.999 |
| 3 | MCM373 BMS0360 | 1.000 |

Tabella 6.9 Percentuali di attribuzione di paternità univoca ottenute con le simulazioni utilizzando in successione le multiplex 1 2 3

L'uso dei marcatori delle multiplex 1 e 2 insieme permetteva di assegnare ciascuna figlia simulata ad uno solo dei 10 possibili nel 99.9% dei casi.

Infine l'utilizzo di tutti e 10 microsatelliti scelti consentiva di raggiungere una percentuale di corretta attribuzione della paternità del 100%.

I risultati delle simulazioni indicano che il panel dei microsatelliti scelti presenta un'ottima risoluzione delle paternità, soprattutto se si considera che i genotipi delle madri non sono stati tenuti in considerazione. Qualora la genotipizzazione degli animali di un gregge o, quantomeno della rimonta allevata annualmente, diventasse una prassi la disponibilità dei genotipi materni, che negli anni verrebbero ad accumularsi, consentirebbe di stabilire con maggior certezza l'ascendenza paterna di ciascun agnello.

Lo scenario analizzato nelle simulazioni, tuttavia, era quello di un gregge in cui 1000 agnelli fossero figli di 10 padri non imparentati. E' evidente che un'eventuale parentela tra gli arieti, quindi una maggior somiglianza dei rispettivi genotipi, aumenterebbe la probabilità che una figlia sia compatibile con più di un ariete, riducendo la probabilità di attribuzione univoca della paternità. Uno studio ulteriore realizzato simulando (1000 repliche) l'esistenza di 5 coppie di fratelli pieni per gregge, ha dimostrato che in questo caso, la percentuale di attribuzioni di paternità univoche variava, nelle 1000 repliche, tra 83,3 e 100%, anche utilizzando tutti i microsatelliti. Tali oscillazioni nei risultati sono attribuibili alla variabilità delle frequenze alleliche dei greggi simulati. Tuttavia, anche considerando un grado di parentela così elevato tra maschi (quello tra fratelli pieni), e poco probabile nelle situazioni reali, la percentuale di attribuzioni di paternità univoche è risultata in media del $97,7 \pm 1,88$ % e inferiore al 95% in solo il 6% delle repliche simulate.

I risultati confermano che il panel di microsatellite scelti presenta un contenuto informativo sufficiente non solo ad ottenere un'elevata accuratezza nei test di conferma delle paternità ma anche ad identificare correttamente un genitore nel caso di accoppiamenti non controllati.

7. Discussione e conclusioni

7 Discussione e conclusioni

La conoscenza del genoma animale costituisce un potente strumento per la gestione genetica delle popolazioni zootecniche, sia per quanto concerne il miglioramento dei caratteri di interesse economico, che per studiare la diversità delle razze allevate al fine di preservare la biodiversità. Il primo passo per lo sfruttamento delle informazioni molecolari è la costituzione di una bio – banca, cioè di una raccolta di campioni biologici dai quali estrarre il DNA per intraprendere le sperimentazioni necessarie alla ricerca di geni o marcatori di interesse ed eventualmente alla loro utilizzazione. Sotto questo punto di vista, l'utilizzo delle cellule somatiche del latte, quale fonte di DNA, rappresenta un'allettante alternativa ad altre matrici biologiche. La raccolta di campioni di latte individuale fa parte integrante dei controlli funzionali degli schemi di selezione degli animali da latte e non richiede personale specializzato. Il latte peraltro, addizionato di conservante, consente di essere trasportato facilmente presso i laboratori di analisi per essere immediatamente processato o conservato anche per lunghi periodi a -20C.

Nell'ambito di questa tesi è stato messo a punto un protocollo di estrazione del DNA dalle cellule somatiche del latte rapido, economico e basato sull'utilizzo di reagenti non tossici per l'operatore.

La quantità del DNA estratto dalle cellule somatiche del latte, sia refrigerato che congelato per un mese, con tale metodica è risultata superiore a quella ottenuta, dagli stessi campioni, utilizzando per l'estrazione un kit di commerciale.

Considerata la semplicità del metodo il livello di contaminazione proteica, testimoniato dal rapporto di assorbanza a 260nm e 280nm, può considerarsi accettabile e comunque

comparabile a quello ottenuto con estrazione da kit. Un'ulteriore diluizione dell'estratto permette di ottenere la concentrazione ottimale per la reazione di PCR e soprattutto di ridurre la quantità di inibitori eventualmente non del tutto eliminati nei passaggi precedenti.

In questo lavoro il DNA ottenuto da 20 ml di latte è risultato idoneo per le analisi molecolari basate sulla PCR, quali la Real Time PCR con metodo TaqMan e l'amplificazione di specifici primer.

Tutti i campioni di latte processati con la metodica rapida 2 hanno dato il prodotto di amplificazione atteso.

Il protocollo di estrazione si presta ad un'applicazione in routine volta, sia alla determinazione del genotipo al locus Prp negli ovini, che alla determinazione del genotipo a loci microsatelliti utili per la caratterizzazione genetica delle popolazioni, per le analisi di parentela e per l'identificazione di geni utili al miglioramento quanti-qualitativo delle produzioni, nonché per la tracciabilità delle produzioni.

La prima applicazione studiata nell'ambito di questo lavoro è stata quella della messa a punto di un sistema di microsatelliti per la verifica e l'attribuzione delle paternità negli ovini di razza Sarda. La conoscenza delle relazioni di parentela tra individui è infatti alla base di ogni corretta valutazione genetica e il primo requisito per una selezione di successo. Israel e Weller,(2000) hanno dimostrato, attraverso simulazioni, che l'erronea identificazione del 10% delle paternità può ridurre del 4% il progresso genetico annuo di una popolazione. E' stato inoltre provato che erronee registrazioni genealogiche riducono il valore della stima dell'ereditabilità dei caratteri (Banos *et al.*,2000; Senneke *et al.*,2007). Vissher *et al.*,(2000) stimarono che circa il 10% delle paternità sono erroneamente registrate nelle popolazioni bovine da latte della Gran Bretagna, mentre Jimenez-Gamero *et al.*,(2006) individuarono il 16.2% di errate relazioni madre-figlia in diversi greggi del nucleo di selezione della razza

caprina Murciano-Granadina. Negli ovini di razza Sarda l'accertamento delle paternità viene verificato solo per i giovani maschi da iscrivere al Libro Genealogico attraverso la comparazione del loro genotipo per un gruppo di microsatelliti con quello dei presunti genitori. Raramente vengono accertate le genealogie delle pecore. E' quindi presumibile che numerosi errori siano presenti nelle registrazioni genealogiche della razza con ripercussioni negative sulla precisione degli indici genetici e quindi sul progresso genetico realizzato. Inoltre un numero elevato di pecore iscritte al Libro Genealogico presenta genealogia sconosciuta. Si tratta non solo degli animali appartenenti a greggi di nuova iscrizione al LG, che costituiscono annualmente circa il 10-11% del totale, ma anche di tutti quelli nati da accoppiamenti in monta naturale non controllata (Salaris *et al.*,2008). Tali animali, che vengono tuttavia sottoposti ai controlli funzionali, non subiscono una valutazione genetica precisa, in quanto basata solo sulle loro performances e su quelle delle loro contemporanee, e non contribuiscono alla valutazione genetica di altri individui.

Con questo studio si è selezionato un panel di microsatelliti, specifico per la razza ovina Sarda, che presenta un contenuto informativo tale da fornire non solo un'elevata probabilità di esclusione delle paternità (0.99996), ma anche un'elevata probabilità di attribuzione della paternità nel caso di gruppi di monta con più riproduttori maschi. Come mostrato da Sherman *et al.*,(2004) l'attribuzione univoca di un padre dipende, non solo dalle caratteristiche del sistema di marcatori scelto, ma anche dal numero di padri candidati e dalle relazioni di parentela tra questi. Le simulazioni realizzate indicano che anche nel caso di elevato grado di parentela tra possibili genitori il panel di microsatelliti scelto permette di limitare notevolmente il numero di padri compatibili.

I microsatelliti scelti sono stati organizzati in un sistema di 3 multiplex. Due di queste (per un totale di 8 marcatori), possono essere analizzate con un'unica analisi al sequenziatore,

mantenendo un elevato potere discriminante per l'attribuzione delle paternità ma con risparmio di costi e tempi di lavoro.

La possibilità di ricostruzione dei pedigree a partire dalle informazioni molecolari consente non solo di sfruttare al meglio le informazioni produttive degli animali controllati di nuova iscrizione al LG, ma anche di affrancarsi dall'onerosa registrazione di accoppiamenti e parti, in quanto può essere realizzata in qualsiasi momento della carriera produttiva di un animale. Tale possibilità è ancora più vantaggiosa se la matrice biologica per l'ottenimento del DNA può essere reperita nell'ambito di un sistema già implementato con altre finalità quale quello dei controlli funzionali per la qualità del latte.

Un'analisi simile, se effettuata in routine, potrebbe favorire un maggior numero di adesioni ai programmi di selezione e l'iscrizione ai libri genealogici. Da questo punto di vista, l'estrazione del DNA da latte potrebbe rivelarsi molto utile per specie o razze, per le quali la gestione genetica della popolazione è ancora meno organizzata di quella ovina. La specie caprina allevata in Sardegna ad esempio risente dell'assenza di uno schema di selezione ben strutturato, a causa da un lato della mancanza di chiari obiettivi selettivi e dall'altro dell'estrema eterogeneità dei sistemi di allevamento e della notevole variabilità genetica della popolazione. La messa a punto di un sistema molecolare per l'individuazione degli animali (o degli allevamenti) da ascrivere a diversi tipi genetici (razze esotiche specializzate, animali incrociati, tipi genetici autoctoni) potrebbe contribuire all'elaborazione di piani di conservazione e/o miglioramento genetico adatti a ognuno di essi e alle loro differenti destinazioni produttive.

Nel prossimo futuro si provvederà a sottoporre il sistema di attribuzione delle paternità, messo a punto nell'ambito di questa tesi, agli organismi responsabili della gestione dello schema di selezione della razza ovina Sarda al fine di cercare di applicarlo in routine. A tal scopo la

collaborazione dell'Associazione Regionale Allevatori Sardegna, attualmente preposta alla realizzazione delle analisi del latte dei ruminanti allevati nell'isola e, dotata delle strutture e competenze tecniche e scientifiche per la sua implementazione, sarà indispensabile.

BIBLIOGRAFIA

8 Bibliografia

Ajmone Marsan P., Crepaldi P, Colli L, Pellecchia M, Negrini R, (2008): *La genetica molecolare per lo studio della biodiversità ovi-caprina in Europa*. Suppl. Large Animal Review 14: 2-5;

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 allelic AFLP markers*. Animal Genetics, 33: 280-286;

Akyuz, B., Ertugrul O, (2006): *Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Turkish native and Holstein cattle.*, Acta Vet Hung 54:173-8;

Aleandri R. & Di Gregorio P. (1994): *Somatic cells in goat milk as DNA source*. Proc. Int. Symp. Somatic cells and milk of small ruminant, Bella (P.Z.) Italy settembre 26-27;

Allain D., Schibler L., Mura L., Barillet F., Sechi T., Rupp R., Casu S., Cribiu, E.P., Carta A. (2006): *QTL detection with DNA markers for wool traits in a sheep backcross Sarda × Lacaune resource population*. 8th WCGALP. Belo Horizonte, MG, Brazil, August 13-18. CD-ROM Commun. No. 05–07;

Amills, M., O. Francino, M. Janasa, and Sanchez A., (1997): *Isolation of genomic DNA from Milk samples by using Chelex resin*. Journal Dairy Res. 64: 231-238;

Andersson L et al., (1994): *Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs*. Science 263, 1771-4;

Angiolillo A., Marcel Amills M., Urrutia B., Doménech A., Sastre Y., Badaoui B., Jordana J. (2007): *Identification of a single nucleotide polymorphism at intron 16 of the caprine Acyl-CoenzymeA; diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) gene*. Journal of Dairy Res. 74:47-51;

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: 271-273;

AssoNaPa (1998): *Norme tecniche allegare al disciplinare del Libro Genealogico della specie caprina, razza Sarda*. <http://www.assonapa.com.>;

Banos G., Wiggans G.R., and Powell R.L. (2001): *Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparison*. Journal Dairy Science. 84: 2523-2529;

Barillet F., Arranz, J.J. Carta, A., Jacquiet, P., Stear, M., Bishop, S. (2006b): *Final consolidated report of the European Union contract of acronym “genesheepsafety” (QLK5-CT-2000-00656)*, p. 145;

Barillet, F. (1997): *Genetics of Milk Production. in Genetics of sheep*. CAB International, eds L. Piper and A. Ruvinsky. Wallingford, Oxon. UK. 523-564;

Barillet F., Arranz JJ, Carta A. (2005): *Mapping quantitative trait loci for milk production and genetic polymorphisms of milk proteins in dairy sheep* Genet. Sel. Evol. Vol 37 (1) Special Issue: International Workshop on Major Genes and QTL in Sheep and Goats: 109-123;

Baumung R, Cubric-Curik V., Schwend K., Achmann R., Solkner J. (2006): *Genetic characterisation and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information* Journal of Animal Breeding and Genetics, 123: 265-271;

Beja-Pereira, A., Alexandrino, P., Bessa, I., Carretero, Y., Dunner, S., Ferrand, N., Jordana, J., Laloe, D., Moazami-Gourdazi, K., Sanchez, A&Canon J. (2003): *Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: a historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites*. Journal of Heredity, 94: 243 – 50;

Bergonier D., Longo F., Lagriffoul G., Consalvi P.J., Van der Wiele A., Berthelot X., (1996a): *Fréquence et persistance des staphylocoques coagulase négative au tarissement et relations avec la numération cellulaires chez la brebis laitière*. Proceedings of International Symposium on Somatic cells and milk of Small Ruminants, Wageningen Pers, Wageningen(the Netherlands) 211;

Bhebhe E., Kogi J., Holder E. et al.,(1994): *Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP 6, 7, 8, 9 and 10 loci*. Animal Genetics 25, 203;

Binns M.M., Holmes N.G., Holliman A. and Scott A.M.,(1995): The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in throughbred parentage testing. *Br. Vet. J.* 151: 9-15;

Biodiversity-the web of life, Sustaining life on Earth, 2000
<http://www.biodiv.org/doc/publications/cbd-sustain-en.pdf>

Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L.F., Hawkins G.A., Solinas Toldo S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J. & Beattie C.W.(1994): *A genetic linkage map for cattle*. *Genetics* 136: 619-639.

Blattman e Beth,(1992): Dinucleotide repeat polymorphism within the ovine major histocompatibility complex. *Animal Genetics* 23(4):392;

Blin N. and Stafford, D.W.,(1976): *A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes*. *Nucleic Acid Res.*, 3: 3303-3309;

Bowling AT, Eggleston-Stott ML, Byrns G, Clark RS, Dileanis S, Wictum E,(1997): *Validation of microsatellite markers four routine horse parentage testing*. *AnimalGenetics*, 28: 247-252;

Bowthell D.D.,(1987): Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal. Biochem.* May 1 ; 162(2),463-465;

Branca A., Casu S.,(1986): *Profils génétiques visibles de la chèvre Sarde. Populations traditionnelles et premières races standardisées d'Ovicaprinae dans le bassin méditerranéen.* Gontard/Manosque (France), 30 Juin-2 Juillet, 1986. Ed. INRA, Paris, 1988 (Les Colloques de l'INRA, n° 47);

Brandano P., Piras B.,(1978): *La capra Sarda I caratteri morfologici.* Ann. Fac. Agr. Sassari, 26, 232-265;

Bruford M. and the ECONOGENE Consortium,(2005) *Strategies for integrating husbandry, genetics, geographic and socio-economic data for sustainable conservation International Workshop on the role of Biotechnology for the characterisation and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources- ECONOGENE Session*

Buchanan F.C., Adams L.J., Littlejohn R.P., Maddox J.F., Crawford A.M. (1994): *Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites* Genomics, 22: 397-403;

Calderini P., A. Fagiolo, R. Colafrancesco & F. de Michelis, (1992): *Andamento delle cellule somatiche nel latte in un gruppo di capre sottoposte a sincronizzazione degli estri ed inseminazione strumentale.* Atti X Congresso Internazionale della Società Italiana di Patologia e Allevamento degli ovini e dei caprini. Pp. 246- 248;

Canon J., D. Garcia, M. A. Garcia-Atance, G. Obexer-Ruff, J. A. Lenstra, P. Ajmone-Marsan, S. Dunner and The ECONOGENE Consortium (2006): *Geographical partitioning of goat diversity in Europe and the Middle East*. *Animal Genetics*, 37: 327–334;

Cappuccio I., L. Pariset, P. Ajmone-Marsan, S. Dunner, O. Cortes, G. Erhardt, G. Lühken, K. Gutscher, S. Joost, I.J. Nijman, J.A. Lenstra, P.R. England, S. Zundel, G. Obexer-Ruff, A. Beja-Pereira A., Valentini A. and The Econogene Consortium,(2006): Allele frequencies and diversity parameters of 27 single nucleotide polymorphism within and goat breeds. *Molecular Ecology NOTES*, 6: 992-997;

Calus M.P.L., Meuwissen T.H.E., de Roos A.P.W., Lenstra J.A. and Veekamp R.F., (2008): *Accuracy of Genomic Selection Using Different Methods to Define Haplotypes*. *Genetics* , Vol. 178: 553-561;

Carta A., Barillet F., Casu Sara, Cribiu E.P., Elsen JM., Fraghì A., Mura L., Schibler L. (2003) *A genome scan to detect QTL affecting dairy traits in a dairy sheep backcross Sarda x Lacaune population* *Italian Journal of Animal Science*, 2 (SUPPL.1): 31-33;

Carta A., Casu Sara, Salaris S.,(2008): *Problematiche della selezione ovina: impatto della genetica molecolare*. *Supplemento Large Animal Review 2008*; 14: 104-106;

Carta A., Casu Sara, Usai M.G., Addis M., Fiori M., Fraghì A., Miari S., Mura L., Piredda G., Schibler L., Sechi T., Elsen J.M., Barillet F.(2008): *Investigating the genetic component of fatty acid content in sheep milk* *Small Ruminant Research* 79: 22–28;

Carta A., Piredda G., Fiori M., Leroux C., Barillet F.(2003b) *A genome scan to detect QTL for CLA content in the milk fat of dairy sheep*. 54th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 31 August-2 September, Roma, Italy, , Book of Abstract, 89;

Carta A., Sechi T., Usai M.G., Addis M., Fiori M., Fraghi A., Miari S., Mura L., Piredda G., Elsen J.M., Schibler L., Barillet F., Casu S.(2006) *Evidence for a QTL affecting the synthesis of conjugated linoleic acid cis 9, trans 11 from trans 11-c18:1 acid on ovine chromosome 22*. 8th WCGALP. Belo Horizonte, MG, Brazil, August 13-18. CD-ROM Commun. No. 12–03;

Carta, A., and E. Ugarte, (2003) *Breeding goals and new perspectives in dairy sheep programs*. Book of abstract of the 54th Annual Meeting of the European Association for Animal Production No 9. Rome, Italy, .31 August – 3 September. Wageningen Academic Publishers;

Carta, A., Barillet, F., Allain, D., Amigues, Y., Bib'e, B., Bodin, L., Casu, Sara., Crihiu, E.P., Elsen, J.M., Fraghi, A., Gruner, L., Jacquiet, P., Ligios, S., Marie-Etancelin, C., Mura, L., Piredda, G., Rupp, R., Sanna, S.R., Scala, A., Schibler, L., Casu, S., (2002). *QTL detection with genomic markers in a dairy sheep backcross Sarda×Lacaune resource population*. In: Proceedings of the Seventh World Congress. Genet. Appl. Livest. Prod, Montpellier,France (CD-ROM communication 01–40);

Casu Sara, M.G. Usai, T. Sechi., S. Miari, S. Porcu, S. Ligios & A. Carta. (2006) *Genetic Characterization of Sardinian Pig population using microsatellite markers* International Congress of Animal Genetics ISAG, Porto Seguro, Brazil, August 20 – 25;

Casu Sara, Marie C., Cribu E., Mura L., Sechi T., Fraghì A., Barillet F., Carta A. (2004) *Identificazione di QTL che influenzano la morfologia della mammella negli ovini da latte*. 16th SIPAOC Nat. Congr., Siena, Italy, September 29-October 2 : 25;

Casu Sara, Robert-Granié C., Barillet F., Carta A., Elsen JM.(2004) *Identificazione di QTL che influenzano l'emissione del latte negli ovini*. 16th SIPAOC Nat. Congr., Siena, Italy, September 29-October 2 : 256. 2004c;

Casu Sara, Sechi T., Miari S., Usai M.G., Mura L., Carta A.,(2006): *Utilizzazione di microsatelliti per l'assegnazione della paternità negli ovini*. XVII National Congress SIPAOC. Lamezia Terme (CZ) 25-28 October 2006: 197;

Casu, Sara, I. Pernazza, and A. Carta,(2006). *Feasibility of a linear scoring method of udder morphology for the selection scheme of Sardinian sheep*. Journal Dairy Science, 89:2200-2209;

Cho G.J., Cho B.W.,(2003): *Validation of microsatellite markers for routine canine parentage testing in Korea*. Journal Genetics, 25: 103-108;

Cho GJ, Cho BW,(2004): *Microsatellite DNA typing using 16 markers for parentage verification of the Korean native horse*. Journal Animal Science, 17: 750-754;

Ciampolini, R., Cetica, V., Ciani, E., Mozzanti, E., Fosella, X., Marroni, F., et al., (2006). *Statistical analysis of individual assignment tests among four cattle breeds using fifteen STR loci*. Journal of Animal Science, 84:11-19;

Cosseddu A. M., (1984). *Le cellule del latte: problemi analitici e ispettivi*;

Cremonesi, P., B. Castiglioni, G. Malferrari, I. Biunno, C. Vimercati, P. moroni, S. Moranti, and M. Luzzana. (2006): *Improved method for rapid extraction of mastitis pathogens directly from milk*. Journal.dairy Science 89: 163 – 169;

Crepaldi P., Nicoloso L., Milanese E., Negrini R., (2008): *Tracciabilità molecolare: uno strumento di valorizzazione delle risorse ovi-caprine e dei prodotti tipici*. Supplemento Large Animal Review 2008; 14: 10-12;

Curi R.A., Lopes C.R.,(2002): *Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequency in a population of Gyr breed bovines*. Braz. Journal Vet. Res. Anim. Sci. 39, 129-135;

D'Angelo F, Santillo A, Sevi A, and Albenzio M, (2007): *Technical Note: A Simple Salting-Out Method for DNA Extration from Milk Somatic Cells: Investigation into the Goat CSN1S1 Gene*. Journal Dairy Science, 90: 3550-3555;

Dakin E.E., and Avise J.C.,(2004): *Microsatellite null alleles in parentage analysis*. Heredity (2004) 93: 504-509;

Dalvit C., De Marchi M. and Cassandro M., (2007): *Genetic traceability of livestock products: A review* Meat Science, Volume 77, Issue 4, December 2007, Pages 437-449;

Dekkers J.C.M. (2004): *Commercial application of marker and gene assisted selection in livestock: strategies and lessons*. Journal of Animal Science., 82 E-Suppl.:313-328;

De Marchi, M., Dalvit, C., Targhetta, C. & Cassandro, M., (2006). *Assessing genetic diversity in indigenous Veneto chicken breeds using AFLP markers*. Animal Genetics, 37: 101-105;

Denise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfeld D, McKenna S, Sharp T and Edwards J, (2003): *Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using canine microsatellite markers*. Animal Genetics, 35: 14-17;

Dwight SS, Eppig JT, et al (2000): *Gene Ontology: tool for the unification of biology*. Nat Genetics, 25: 25-29;

EC. (2003). Commission Decision No 100/2003 Laying down minimum requirements for the establishment of breeding programmes for resistance to transmissible spongiform encephalopathies in sheep (notified under document number C(2003) 498) O.J. L041 of 14.02.2003:41-45.

ECONOGENE <http://www.econogene.eu/>

Ellegren H, Johansson M, Sandberg K, Andersson L., (1992): *Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse*. *Animal Genetics* 1992, 23, 133-142;

Elsen J.M., Andreoletti O., Barillet F., François D., Lantier F., Moreno C.,Palhiere I., Schelder F., (2002): *Le controle des pathologies des petit ruminants par la genetique, avec l'exemple des EST*. XV Congr. Naz. SIPAOC 11-14/09/2002 Chia (Ca) Italy;

Ernst CA, & Dentine MR,(1992): *Genotyping of dairy cattle using direct amplication of DNA from somatic cells in small volumes of milk*. *Animal Genetics* 23 (supp.1): 56;

European Cattle Genetic Diversity Consortium (2006) *Marker-assisted conservation of European cattle breeds: an evaluation*. *Animal Genetics*, 37: 475–481;

Fadlaoui et al.(2006): *Setting priorities in farm animal conservation choices-expert opinion and revealed policy preferences*. *European Review of Agricultural Economics* 33(2):173-192;

Falconer D.S. et Mackay T.F.C.,(1996). *Introduction to quantitative genetics*. 4th Edition. Longmn. pp 464;

FAO,(1999): *The global strategy for the Management of Farm. Anim. Genet. Res*. FAO, Rome, Italy;

FAO (2007): *The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*, edited by Barbara Riscowsky & Dafydd Pilling. Rome;

Filippini F., Sbarra F., Palazzo R., Panella F., Lasagna E., Valentini A. Ajmone Marsan P., (2005): *La banca del DNA delle razze bovine italiane da carne*;

Freeman AR, Bradley DG, Nagda S, Gibson JP, Hanotte O., (2005): *Combination of multiple microsatellite data sets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle*
Animal Genetics, 37(1):1-9;

Fruganti G., Ranucci S., Valente C., (1983): Sul valore diagnostico di alcune prove di laboratorio nelle mastiti della pecora. *La Clinica Veterinaria*, 106: 145-155;

Fuji, J., Otsu, K. et De Zozzato, F., (1991) *Identification of a mutation in porcine synanodine receptor associated with malignant hyperthermia*. *Science*, 253: 448–451;

Gentile A., Testoni S., Diana A. (2004) *Complex Vertebral Malformation (CVM) in a calf*
Proceedings V Middle-European Buiatric Congress, 2-5/06/2004, Hajduszoboszlo, Ungheria,
pagg. 460-465;

Gerardi, A.S. (1996): *Bovine leukocyte adhesion deficiency - a brief overview of a modern disease and its implications*, *Acta Veterinaria Hungarica* 44:1-8;

Glowatzki-Mullis M.L., Muntwyler ML, Gaillard J, C., (2007): *Cost-effective parentage verification with 17-plex PCR for goats and 19-plex PCR for sheep*. *Animal Genetics* 38: 86-88;

Glowatzki-Mullis, M-L.; Gaillard, C.; Wigger, G. Fries, R., (1995): *Microsatellite-based parentage control in cattle*. *Animal Genetics*, 26: 7-12;

Grigaliunaite Ilma, Tapio Miika, Viinalass Haldja, Grislis Ziedonis, Kantanen Juha, Miceikiene Iona, (2003): *Microsatellite variation in the Baltic sheep breeds*. *Veterinarija ir zootechika*. T.21 (43);

Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C. (2002): *Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition*. *Genome Res*. 12:222-31. 2002;

Groneveld et al., (2008): *A protocol for the cryoconservation of breeds by low-cost emergency cell banks - a pilot study*. *Animal* 2:1-8;

Heaton, M. P., G. P. Harhay, G. L. Bennett, R. T. Stone, W. M. Grosse, E. Casas, J. W. Keele, T. P. Smith, C. G. Chitko-McKown, and W. W. Laegreid., (2002): *Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle*. *Mammalian Genome* 13:272-281;

Heyen, D. W., J. E. Beever, Y. Da, R. E. Everts, C. Green, H. A. Lewin, S. R. E. Bates, and J. S. Ziegle. (1997): *Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing*. *Animal Genetics*, 28:21-27;

Hulme D.J., Silk J.P., Redwin J.M., Barendse W. & Beh K.J. (1994): *Ten polymorphic ovine microsatellites*. *Animal Genetics* 25, 434-435;

Hulme D.J., Smith A.J., Silk J.P. Redwin J.M. & Beh K.J.(1995): *Polymorphic sheep microsatellites at the McM2, McM131, McM135, McM136, McM140, McM200, McM214, McM373, McM505, McM507 and McM512 loci*. *Animal Genetics* 26, 369-370.

Hunter N.,(1997): *Molecular biology and genetics of Scrapie in sheep*. In *The genetics of Sheep*, pp. 225-240. Edited by L. Piper & A. Ruvinsky;

Ibeagha-Awemu, E.M., Jann, O.C., Weimann, C.&Erhardt, G.,(2004): *Genetic diversity, introgression and relationships among West/Central African cattle breeds*. *Genetics Section Evolution*, 36: 673-690;

Isberg SR, Chen Y, Barker SG, Moran C, (2004): *Analysis of microsatellites and parentage testing in saltwater crocodiles*. *Journal of Heredity* 95: 445-449;

Israel, C., and Weller J.I.,(2000): *Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations*. *Journal Dairy Science* 83:181–187;

Ivanovic A., Dovic P., Kavar T., Caput P., Mioc B., Pavic V., Stuhec V., Leto J.,(2004): *Genetic characterization of the Pag island sheep breed based on microsatellite and mtDNA data*. *Small Ruminant Reserce*. 57: 167-174;

Jamieson A. & Taylor St. C.S. (1997) *Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion*. *Animal Genetics*. 28, 397±400;

Jandurova O, Kott T., Kottova B., Czernekova V., (2004): *Seven microsatellite markers useful for determining genetic variability in white and brown short-haired goat breeds*. *Small Rumin.Res.* 52: 271-274;

Jimenez-Gamero I., Dorado G., Munoz-Serrano A., Analla M., Alonso-Moraga A.,(2006): *DNA microsatellite to ascertain pedigree-recorded information in a selecting of Murciano-Granadina dairy goats*. *Small Ruminant Research* 65: 266-273;

Joshi, M.B., Rout, P.K., Mandal, A.K., Tyler-Smith, C., Singh, L.&Thangaraj, K.,(2004): *Phylogeography and origin of Indian domestic goats*. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 454-462;

Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopez- Corales NL, Beattie CW,(1997): *A second-generation linkage map of the bovine genome*. *Genome Res.* 7(3):235-49;

Kemp S. J., Hishida O., Wambugu J., Rink A., Longeri M.L., Ma, R.Z., Da, Y., Lewin H.A., Barendse W., Teale A. J., (1995): *A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers*. *Animal Genetics*, 26: 299-306;

Kimura M. & Crow J.F (1964) *The number of alleles that can be maintained in a finite population*. Genetics, 49 725-738;

Kotze A., Swart H., Grobler J., Nemaangani A., (2004): *A genetic profile of the Kalahari Red goat breed from sothern Africa*. S. Afr. Journal Animal Science, 34 (Suppl. 1), 10-12;

Kupiec, J., Giron, M.L., Vilette, D.et al.,. (1987) *Isolation of high-molecular weight DNA from eukaryotic cells by formamide treatment and dialysis*. Anal. Biochem., 164: 53-58;

Lasagna E., Sarti F.M., Sorbolini S, De Martino F., Panella F.,(2005): Estrazione di DNA da differenti fonti tissutali animali per la costituzione di una banca del genoma della razza Chianina. 4th World Italian Beef, Italy, April 29th-May 1th, 2005;

Ledda A., Arrizza S., (1974). *Rispondenza del California Mastitis Test nella valutazione del contenuto in leucociti del latte di pecora*. Sci. e Tec. Lattiero-casearia 25 (3): 112-119

Le Roy P.,(2001) QTL De la détection à l'utilisation Séminaire du Département de Génétique animale de l'INRA. 2001.

Lee Sun-Young, Gil-Jae Cho,(2006): *Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing*. Journal Vet.Science, 7(1): 63-67;

Ligos S., Carta, A., Bitti P.L., Tuveri I.,(2004) *Description of goat farming systems in Sardinia and the evaluation of genetic improvement strategies Options Méditerranéennes*, A-61: 97-104;

Lindquist S, Hansson L, Hernell O, Lonnerdal B, Normark J, Stromqvist M, Bergstrom S.,(1994) *Isolation of messenger-RNA and genomic DNA from epithelial-cells in human-milk and amplification by PCR*. *Biotechniques*.;17:692–696;

Lipkin E, Mosig MO, Darvasi A, Ezra E, Shalom A, Friedmann A & Soller M.,(1998): *Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective milk DNA pooling using di nucleotide micro satellite markers analysis milk protein parentage*. *Genetics* 149: 1557-1567;

Lipkin E, Shalom Anne, Khatib H, Soller M, and Friedmann A.,(1993): *Milk as Source of Deoxyribonucleic Acid and as Substrate for the Polymerase Chain Reaction*. *Journal Dairy Science*, 76: 2025-2032;

Loftus R.,(2005): *Traceability of biotech-derived animals: application of DNA technology*. *Rev.Sci.tech. Off.int.Epiz*, 24(1): 231-242;

Luikart G., M-P Biju-Duval, O. Ertugrul, Y Zagduseren, C. Maudet, P. Taberlet,(1999): *Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (Capra hircus)*. *Animal Genetics*, 30: 431-438;

Macciotta N.P.P., Cappio-Borlino A., Steri R., Pulina G., Brandano P.,(2000). *Analisi fattoriale della struttura latente della variabilità somatica della capra Sarda*. Atti S.I.P.A.O.C., 14, 299-302;

Macciotta, N.P.P., Cappio-Borlino A., Steri R., Pulina G., Brandano P.,(2002) *Somatic variability of Sarda goat breed analysed by multivariate methods* Livestock Production Science, 75(1): 51-58;

Maddox J.F., Schibler L., Cribiu E.P., Kang N., Davies K.P. & Vaiman D.,(2000): *Linkage mapping of goat ChirUCO, LSCV and SR-CRSP microsatellites in sheep*. Animal Genetics 31, 145. correction 292-293;

Malek M, Dekkers JC, Lee HK, Baas TJ, Prusa K, Huff-Lonergan E, Rothschild MF.,(2001) *A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig*. II. Meat and muscle composition Mammalian Genome, 12(8):637-45;

Manfredini M., Stipa S., Nanni N., Boattini B.,(1993). *Variazioni annuali dei principali caratteri qualitativi del latte ovino di massa in alcuni allevamenti dell'Emilia Romagna*. Sci. e Tec. Lattiero-casearia 44 (6): 407-422;

Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K. & Andersson L.,(1994): *Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites*. Animal Genetics 25, 19±23;

Meuwissen and Goddard,(1996) *The use of marker haplotypes in animal breeding scheme*
Genet.Sel.Evol.(1996) 28:161-176;

Moore S.S., Byrne K., Berger K.T., Barendse W., McCarthy F., Womack J.E. & Hetzel
D.J.,(1994): *Characterization of 65 bovine microsatellites*. Mammalian Genome 5, 84-90;

Morgante M., Ranucci S., Casoli C.,(1994). *Caratteristiche citologiche del secreto mammario
di pecore pluripare in lattazione*. Obiettivi & Documenti Veterinari, 3: 51-55;

Muelas R., Molina P., Diaz J.R., Peris C.,(1996). *Relationship between somatic cell count,
acidity and California Mastitis Test in Manchega ewes milk*. Proceedings of Intenational
Symposium on Somatic cells and milk of Small Ruminants. Wageningen Pers, Wageningen
(the Netherlands) 239-244;

Mullis, K.B.,(1990) *The unusual origin of the polymerase chain reaction* Scientific American,
262:56-65;

Mura L., Schibler L., Carta A., Casu Sara, Fozzi P., Fraghì A., Sechi T., Barillet F., Cribiu
E.,(2002). *Contenuto informativo di un panel di marcatori Microsatelliti negli ovini di razza
Sarda*. XV Congresso Nazionale SIPAOC 11/14 Settembre 2002-Cagliari;

Murphy Michael A, Shariflou Mohammad Reza and Chris Moran,(2002): *High quality
genomic DNA extraction from large milk samples*. Journal of Dairy Res., 69: 645-649;

Nagahata, H., Nochi, H., Tamoto, K., Taniyama, H., Noda, H., Morita, M., Kanamaki, M., Kociba, G.J.,(1993): *Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Holstein Cattle*, *Canadian Journal of Veterinary Research - Revue Canadienne de Recherche Veterinaire* 57:255-261;

Negrini R., Nicoloso L. and P. Ajmone Marsan,(2008): *Assessing SNP markers for assigning individuals to cattle populations*. *Animal Genetics*.40: 18-26;

Negrini, R., Milanesi, E., Bozzi, R., Pellecchia, M., & Ajmone-Marsan P.,(2006). *Tuscany autochthonous cattle breeds: an original genetic re source investigated by AFLP markers*. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 123: 10-16;

Nezer C., L. Moreau, D. Wagenaar, M. Georges,(2002) *Results of a whole genome scan targeting QTL for growth and carcass traits in a Piétrain X Large White intercross* *Genetics Selection Evolution*, 34:371-387;

Okada M.,(1960). *Histology of the mammary gland,VII° Histological and Histochemical studies of cells in the milk of domestic animals*. *Tohoku Journal of Agricultural Res.*, 11: 31-51;

Oldenbroek J.K.,(1999) *Genebanks and the Conservation of Animal Genetic Resources* ID-DLO, Lelystad, The Netherlands;

OnerY, Keskin A. and Elmaci Adv.,(2010): *Identification of BLAD, DUMPS, Citrullinamia and Factor XI Deficiency in Holstein Cattle in Turkey*. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 5(1): 60-65;

Paape M, J., G. R. Wiggans, D.D.Bannerman, D. L. Thomas, A. H. Sanders, A. Contreras , P. Moroni and R. H. Miller,(2007): *Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts*. Small Ruminant Res. 68: 114 – 125;

Pagnacco G., Carta A.,(2003). In “*Marker assisted selection: a fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?*”. 17- 18 Ottobre 2003, Torino, Italy;

Pagnacco G., Bagnato A., Canavesi F., Carta A., Cassandro M., Santus E.,(2006). In “*Acquisizioni della genetica e prospettive della selezione animale*”.I Georgofili. Quaderni 2006-I. 49-78. Ed: Società Editrice Fiorentina;

Pagnacco G., Chessa S.,(2008): *Problematiche selettive negli ovini e nei caprini*. Supplemento Large Animal Review 2008; 14: 113-116;

Pariset L., I. Cappuccio, P. Ajmone Marsan, S. Dunner, G. Luikart, G.Obexer-Ruff, C. Peter, D. Marletta, F. Pilla, A. Valentini, and the ECONOGENE Consortium,(2006a) *Assessment of population structure by single nucleotide polymorphisms (SNPs) in goat breeds* Journal of Chromatography, 833: 117–120;

Pariset L., I. Cappuccio, S. Joost, M.S. D’Andrea, D. Marletta, P. Ajmone Marsan, A. Valentini, and the ECONOGENE Consortium,(2006b) *Characterization of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in sheep and their variation as an evidence of selection* Animal Genetics, 37: 290-292;

Pariset, L.; Savarese, C.; Cappuccio, I.; Valentini, A.,(2003): *Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy*. *Animal Genetics*, 20: 425-432;

Pazzola M., Carcangiu V., Fanari U., Pisano E., Bini P.P., Vacca G.M.,(2003). *Allevamento caprino in Sardegna: Situazione e prospettive*;

Perrin G.G. & C. Baudry,(1993): *Numerations cellulaires du lait de chevre*. *Lait* 73: 511-532;

Peter Ch., M. Bruford, T. Perez, S. Dalamitra, G. Hewitt, G. Erhardt, and the ECONOGENE Consortium,(2006) *Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds* *Animal Genetics*;

Porcu S., Usai G., Cappai P., Carta A. & Ligios S.,(2005b):*Allevamento suino in Sardegna: storia; attualità; prospettive* Corte 11-10-04 Porcu e prisuttu: une affaire de famille ;

Powell, R.L., Norman, H.D., Cowan, C.M.,(1996): *Relationship of bovine leukocyte adhesion deficiency with genetic merit for performance traits*, *Journal of Dairy Science* 79:895-899;

Rejduch, B., Kozubska-Sobocińska, A., Radko, A., Rychlik, T., Słota, E.,(2004). *The application of genetic markers for cell chimerism diagnosis in lambs*. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, Vol. 121, N. 3, pp. 197-203(7);

Roher GA, Freking BA, Nonneman D.,(2007): *Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion*. *Animal Genetics* 38: 253-258;

Rosati R, Militello G, Boselli C, Giangolini G, Amatiste S, Brajon G, Gazzoni S, Casini M, Scatassa M, Bono P, Cannas A, Mugoni G, Simula S, Denti G, Gradassi S, Fagiolo A.,(2005): *Cellule somatiche nel latte ovino e caprino: definizione del valore medio nazionale e del valore fisiologico*. *Scienza e tecnica Lattiero-casearia*, 56(3), 000-000;

Rudbeck L.and Dissing Jorgen,(1998): *Rapid, Simple Alkaline Extraction of Human Genomic DNA from Whole Blood Buccal Epithelial Cells, Semen and Forensic Stains for PCR*. *BioTechniques* Vol. 25, No: 4;

Russo V.,(1993) *Identificazione del genotipo dei suini per la sensibilità all'Alotano a livello di DNA mediante PCR*. *Zoot Nutr Anim* 19, 89-93;

Russo V.,Fontanesi L.,(2001) *Il miglioramento genetico animale:potenzialità dei metodi tradizionali e prospettive della genetica molecolare*. *Zootecnia e Nutrizione Animale* 27,253-284;

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA,(1988):*Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase* *Science*, 239: 487–9;

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.,(1985) *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia* Science, 230: 1350-1354;

Salaris, S., Casu Sara, and Carta A.,(2007). *Investigating the relationship between the prion protein locus and udder morphology traits and milk yield in Sardinian sheep*. Journal Animal Science 2007. 85:2840–2845;

Salaris, S., Casu Sara, Fresi P., Carta A.,(2008): Effect of combining controlled natural mating with artificial insemination on the genetic structure of the flock book of Sardinian breed sheep. Pages 113-122. Proc. 36th ICAR Session, Niagara Falls 16-20 June 2008;

San Cristobal M., C. Chevalet, J. Peleman, H. Heuven, B. Brugmans, M. van Schriek, R. Joosten, A. P. Rattink, B. Harlizius, Groenen M. A. M., Y. Amigues, M.-Y. Boscher, G. Russell, A. Law, R. Davoli, V. Russo, C. Desautes, L. Alderson, E. Fimland, M. Bagga, J. V. Delgado, J. L. Vega-Pla, A. M. Martinez, M. Ramos, P. Glodek, J. N. Meyer, G. Gandini, D. Matassino, K. Siggens, G. Laval, A. Archibald, D. Milan, K. Hammond, R. Cardellino, C. Haley and G. Plastow (2006a) *Genetic diversity in European pigs utilizing amplified fragment length polymorphism markers* Animal Genetics, 37: 232–238;

San Cristobal M., Chevalet C., Haley C.S., Joosten R., Rattink A.P., Harlizius B., Groenen M.A.M., Amigues Y, Boscher M.-Y., Russel G., Law A., Davoli R., Russo V., Désautés C., Alderson L., Fimland E., Bagga M., Delgado J.V., Vega-Pla, J.L., Martinez A.M., Ramos M., Glodek Peter, Meyer, J.N., Gandini G.C., Matassino D., Plastow G.S., Siggens K.W., Laval

G., Archibald A.L., Milan D.,(2006b): *Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers* *Animal Genetics*, 37: 180-198;

Sanders ,K., Bennewitz J., Reinsch N., Thaller G., Prinzeberg E.,, Kunn C., Kalm E.,(2006): *Characterization of the DGAT1 mutations and the CSN1S1 promoter in the German Angeln dairy cattle population*. American Dairy Science Association Savoy, USA, *Journal of Dairy Science*, 89: pp 3164-3174;

Sherman G.B., Kachman S.D., Hungerford L.L., Rupp G.P., Fox C.P., Brown M.D., Feuz B.M., and Holm T.R.,(2004): *Impact of candidate sire number and sire relatedness on DNA polymorphism-based measures of exclusion probability and probability of unambiguous parentage*. *Animal Genetics*, 35: 220-226;

Schaeffer L. R.,(2006): *Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle*. *Journal Anim. Breed. Genet.* 123: 218–223;

Schrooten C., H. Bovenhuis, W. Coppeters, and J.A.M. Van Arendonk,(2000) *Whole Genome Scan to Detect Quantitative Trait Loci for Conformation and Functional Traits in Dairy Cattle* *Journal of Dairy Science*, 83:795–806;

Schuster D.C., Kehrlı M.E., Ackerman jr MR, Gilbert R.O.,(1992): Identification and prevalence of a genetic defect that causes Leukocyte Adhesion Deficiency in holstein cattle. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 89: 9225-9229;

Schwenger B., Schober S., Simon D.,(1993): *DUMPS cattle carry a point mutation in the Uridine Monophosphate syntase gene*. Genomics 16: 241-244;

Secchiari, P A.Serra, M.mele, G.Conte, L.Casarosa,(2008): *Tracciabilità e valorizzazione delle produzioni ovine e caprine*. Supplemento Large Animal Review 2008; 14: 83-85;

Sechi T., Usai M. G., S. Miari, L. Mura, Sara Casu and A. Carta,(2007): *Identifying native animals in crossbred populations: the case of the Sardinian goat population*; 2007 International Society for Animal Genetics, Animal Genetics, 38, 614–620;

Sechi T., Usai M.G., Casu Sara, Carta A.,(2005). *Genetic diversity of Sardinian goat population based on microsatellites XVI A.S.P.A. Congress, Torino 28-30/06 2005*;

Sechi T., Usai M.G., Crasta L., Casu Sara, Carta A.,(2004): *Caratterizzazione della popolazione caprina della Sardegna tramite microsatelliti XVI S.I.P.A.O.C. Congress, Siena 28/9-1/10 2004*;

Seyedabady H., Cyrus Amirinia, Mohammad Hossein Banabazi, Hossein Emrani,(2006): *Parentage verification of Iranian Caspian horse using microsatellites markers*. Iranian Journal of Biotechnology, Vol.4, No 4;

Senneke S.L., Macneil M.D., and Vleck L.D.,(2004): *Effects of sire misidentification on estimates of genetic parameters for birth and weaning weights in Hereford cattle*. Journal Animal Science, August 1; 82(8): 2307 – 2312;

Sereno FTPS, Sereno JRB, Pla-Vega JL, Delgado JV,(2008): *DNA testing for parentage in a conservation nucleus of Pantaneiro horse*. Genet. Mol. Biol. Vol.31 no. 1 Sao Paulo, 2008;

Slate J., Marshall T.and Pemberton J.,(2000): *A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program cervus*. Molecular Ecology, 9: 801-808;

Syvanen AC.,(2001): *Accessing genetic variation genotyping single nucleotide polymorphism*. Nat.Rev. Gen., 2: 930-942;

Smith A.J., Hulme D.J., Silk J.P., Redwin J.M. & Beh K.J.(1995): *Thirteen polymorphic ovine microsatellites*. Animal Genetics 26, 277-278;

Sodhi, M., Mukesh, M., Mishra, B.P., Mitkari, K.R., Prakash, B.&Ahlawat, S.P., (2005): *Evaluation of genetic differentiation in Bos indicus cattle breeds from Marathwada region of India using microsatellite polymorphism*. Animal Biotechnology, 16: 127-137;

Stone R.T., Pulido J.C., Duyk G.M., Kappes S.M., Keele J.W. & Beattie C.W.(1995): *A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences*. Mammalian Genome 6, 714-724;

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 – 3963;

Tozaki T., Kakoi H., Mashima S., Hirota KI, Hasegawa T, Ishida N, Choi-Miura NH, Tomita M,(2001): *Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci*. Journal Vet.Med.Science, 63: 1191-1197;

Tripaldi C.,(1990): *Latte e formaggi*. In: L'allevamento della capra, Ars Grafica- Villa d'Agri pp. 111-145;

Usai M.G., Sara Casu, G. Molle, M. Decandia, S. Ligios, A. Carta,(2006a) *Using cluster analysis to characterize the goat farming system in Sardinia* Livestock Science, 104: 63-76;

Usai M.G., Sechi T., Ligios S., Carta A.,(2004) *Survey on the goat farming system in Sardinia* Proc. XVI Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C Siena, Italy: 333;

Usai M.G., Sechi T., Miari S., Casu Sara, Bouche R., Carta A.,(2006b): *Genetic diversity between Corsican, Sardinian and Maltese breeds using microsatellite* Seguro, Brazil, August 20 – 25;

Usai, MG,(2008). *Investigation of ovine chromosome 20 to detect QTL for fat content in experimental dairy sheep populations*. PhD thesis. Università degli Studi di Sassari;

Usha A.P., Simpson S.P. & Willians J.L.(1995): *Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification*. Animal Genetics 26, 155±61;

Vacca G.M., Chianese L., Ghibellini A., Carcangiu V., Mauriello R., Bini P.P.,(2003): *as1-casein genetic variants in Sarda goat breed*: Proc. XV Congr. A.S.P.A.: vol n. 2 suppl. 1 pp. 55-57;

Van Arendonk J.A.M.,(2009): *The role reproductive technologies in breeding schemes for livestock populations in developing countries*. Livest. Science, (in press.);

Vankan D.M., Faddy M.J.,(1999): *Estimation of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsattelites analysis of multipli-sire matings*. Anim.Genet.30: 355-361;

Vignal Alain, Milan Denis, Magali SanCristobal, Andrè Eggen,(2002): *A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics*. Genet.Selec..Evol. 34: 275-305;

Visscher P.M., Woolliams J.A., Smith D., and Williams J.L.,(2002): *Estimation of pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite markers and the impact on selection*. Journal Dairy Science, 85: 2368-2375;

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., & Kuiper, M.,(1995): *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acid Research, 23: 4407-4410;

William W. Wilfinger, Karol Mackey, and Piotr Chomczynski,(1997): *Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity*. *BioTechniques* 22:474-481 (March 1997);

Zedda M., Manca P., Lepore G., Gadau S., Farina V.,(1999). Studio dei resti faunistici rinvenuti nel corso di scavi archeologici nel quartiere Marina a Cagliari;