



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: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXV CICLO)
(coordinatore: prof. Sergio Ledda)

EFFETTO DEL POLIMORFISMO DEL GENE GH OVINO SULLA PRODUZIONE DI LATTE

Docente Guida

Prof. Giuseppe Massimo Vacca

Direttore

Prof. Giovanni Garippa

Tesi di dottorato del

Dr. Filippo Balia

ANNO ACCADEMICO 2011 - 2012

Indice

1	Introduzione	pag.	2
1.1	La pecora	”	3
1.2	L’allevamento della pecora	”	6
1.3	La pecora di razza Sarda	”	12
1.4	Il ciclo produttivo della pecora di razza Sarda	”	23
1.5	La lattogenesi	”	28
1.6	Il GH: funzioni fisiologiche	”	35
1.7	Il gene del GH ovino	”	41
2	Scopo della ricerca	”	46
3	Materiali e metodi	”	49
4	Risultati	”	55
5	Discussione	”	72
6	Conclusioni	”	82
7	Bibliografia	”	84

1. Introduzione

La pecora

La pecora, assieme alla capra, è una delle prime specie allevate dall'uomo nell'antichità. La domesticazione della pecora avvenne nella regione della Mezzaluna Fertile circa 10 mila anni fa, cioè circa mille anni dopo l'inizio della coltivazione delle prime colture (Zeder, 2008).

Inizialmente la pecora era allevata principalmente per la produzione di carne, ma a partire da 5000 anni fa in Medio Oriente, venne indirizzata per la produzione di altri prodotti, quali la lana e il latte. Un recente studio basato sull'analisi del retrotipo, cioè delle integrazioni retrovirali (Chessa et al. 2009), ha portato ulteriori e numerose informazioni sull'introduzione della pecora in Europa. Da questo lavoro risulta che prima è avvenuta l'immissione nei vari territori delle pecore primitive come il Muflone o le pecore delle isole del Nord Europa, e successivamente l'arrivo delle pecore selezionate per lana e latte.

Nel corso dei millenni si è assistito alla diffusione dell'allevamento della pecora in tutti i continenti, in concomitanza con le migrazioni umane. Le ragioni di questa diffusione sono da ricercare principalmente nelle capacità di adattamento di questa specie e quindi di produrre nonostante le difficili condizioni climatiche e territoriali

che caratterizzano molte aree del pianeta (scarsa vegetazione, terreni impervi, scarsa disponibilità idrica).

La pecora domestica (*Ovis aries*) appartiene al genere *Ovis*, cui fanno parte anche diverse specie selvatiche, che differiscono fra loro per distribuzione geografica, tratti morfologici, taglia, forma delle corna, colore e tipo di mantello (Fedosenko & Blank, 2005), ma anche per numero diploide di cromosomi (Nadler et al., 1973; Bunch et al., 2006).

A dispetto di queste differenze, è possibile l'incrocio di animali appartenenti all'una o all'altra specie, con la generazione di prole fertile (Nadler et al., 1971; Valdez et al., 1978). Ad esempio, in alcune zone dell'Iran, dove coesistono allo stato selvatico il Muflone asiatico e l'Urial, è stata descritta anche la presenza dell'ibrido, con numero cromosomico che può variare da 54 a 58 (Valdez et al., 1978).

La classificazione sistematica del genere *Ovis* nel corso degli anni si è dimostrato quindi un esercizio abbastanza complesso. Nel corso degli anni sono state proposte diverse classificazioni e numerose sono state le revisioni (Hiendleder et al., 2002). La classificazione cui facciamo riferimento è quella proposta da Nadler et al. (1973):

- il Muflone europeo (*O. musimon* Pallas 1762, $2n = 54$),
presente in Europa, compresa la Sardegna;

- il Muflone asiatico (*O. orientalis* Gmelin 1774, $2n = 54$) presente in Turchia e Medio Oriente;
- l'Argali (*O. ammon* L. 1758, $2n = 56$) che vive nelle aree montagnose dell'Asia centrale (Kazakistan, Cina e Mongolia);
- l'Urial (*O. vignei* Blyth 1841, $2n = 58$) largamente distribuito in Asia Minore;
- la Pecora di Dall (*O. dalli* Nelson 1884, $2n = 54$) che vive nelle regioni montagnose della parte occidentale di Canada e Stati Uniti;
- il Big-horn (*O. canadensis* Shaw 1804, $2n = 54$) che si rinviene nelle Montagne Rocciose fra il Canada e il Colorado e a sud fino al Messico;
- la Pecora delle Nevi (*O. nivicola* Eschscholtz 1829, $2n = 52$) che si rinviene principalmente nel nord est dell'Asia (Siberia).

Negli ultimi anni lo studio tassonomico si è avvalso dell'ausilio della biologia molecolare: infatti, attraverso l'utilizzo di diversi markers, la situazione generale appare più chiara che in passato. Studi di filogenesi molecolare, assieme alla conoscenza approfondita dell'etologia e della morfologia, hanno dimostrato che il genere *Ovis* è monofilico e si è distinto dal genere *Capra* circa 2-3 milioni di anni fa. In accordo con la paleontologia, ciò dovrebbe essere avvenuto in Asia.

Un recente studio basato sull'utilizzo di markers mitocondriali e nucleari (Rezaei et al., 2010) ha confermato la validità della classificazione proposta da Nadler et al. (1973), ad l'eccezione di *Ovis musimon*, cui è stata proposta l'inclusione come sottospecie del genere *Ovis orientalis*.

Grazie a studi basati sull'analisi del DNA mitocondriale quest'ultimo è stato identificato come il progenitore della pecora domestica (Groeneveld et al, 2010).

L'allevamento della pecora

Attualmente l'allevamento della pecora è pratica diffusa in tutto il mondo, a tutte le latitudini, con condizioni climatiche vanno dall'arido semidesertico al freddo subpolare. Diverse sono le tipologie di allevamento, che variano dall'intensivo all'estensivo. Inoltre, la specializzazione produttiva e l'adattamento alle diverse condizioni di allevamento ha portato alla diversificazione della specie in differenti razze, caratterizzate da un'estrema variabilità delle caratteristiche fenotipiche.

Oggi nel mondo sono allevate oltre un miliardo di pecore, la maggior parte delle quali si trova in Asia (oltre 450 milioni di capi), seguita da Africa (circa 300 milioni), Europa (circa 130 milioni),

Oceania (circa 100 milioni) e infine America (circa 93 milioni) (FAO, 2010). Il dato asiatico è fortemente influenzato dalla Cina, che con oltre 130 milioni di capi detiene anche il primato mondiale di capi allevati. La quasi totalità della consistenza dell'Oceania è invece appannaggio di due soli stati, cioè Australia (oltre 68 milioni di capi), terzo paese al mondo dopo la Cina e l'India, e Nuova Zelanda (oltre 32 milioni di capi). In Europa il primato appartiene al Regno Unito (31 milioni di capi), seguito da Spagna (oltre 18 milioni) e Grecia (quasi 9 milioni). L'Italia, con oltre 8 milioni di capi si classifica quarta in questa speciale classifica, seguita dalla Francia che invece non raggiunge gli 8 milioni di capi.

Al di là delle consistenze, è interessante verificare la differenza nei dati produttivi dei vari paesi: ad esempio, Cina e Australia sono i maggiori produttori al mondo di lana, con quantità molto simili. In Europa la più alta produzione di lana appartiene al Regno Unito, seguito da Spagna, Romania e Irlanda.

Il primato di carne prodotta appartiene sempre alla Cina che da sola produce quasi un quarto del totale mondiale; in Europa il primato va al Regno Unito, seguito rispettivamente da Spagna e Francia.

Discorso a parte merita il latte, che con una produzione mondiale di 10 milioni di tonnellate nel 2010 risulta essere molto inferiore non solo alla produzione di latte vaccino (quasi 600 milioni di tonnellate) e

bufalino (oltre 92 milioni di tonnellate), ma anche al latte caprino (oltre 16,5 milioni di tonnellate). Quest'ultimo dato può sorprendere, perché la situazione in Italia si capovolge: 600 mila tonnellate di latte ovino contro le 34 mila del latte caprino. Ciò è da evidenziare, poiché nel nostro paese si produce all'incirca il 6% del totale mondiale (10 milioni di tonnellate di latte di pecora per anno), nonostante una consistenza di animali che non raggiunge l'1% del totale mondiale.

Ciò è dovuto al fatto che, nonostante in Italia si allevino anche alcune razze specializzate per la carne e per la lana, il maggior numero di animali appartiene a razze da latte; inoltre recenti piani di selezione genetica e alti livelli di gestione zootecnica hanno fatto sì che si raggiungessero livelli produttivi molto alti (la produzione media nel nostro paese è di 1055 hg/anno contro la media mondiale di 477, considerando anche le razze non specializzate) (FAO, 2010).

Circa il 46% del latte ovino mondiale proviene dall'area mediterranea. Infatti, oltre all'Italia, i più importanti Paesi in termini numerici di pecore e produzione di latte sono la Grecia (750 mila tonnellate e 7.012.467 di animali in produzione), Spagna (360 mila tonnellate e 2.400.000 di animali in produzione), e Francia (254 mila tonnellate e 1.290.000 di animali in produzione) (Carta et al., 2009).

Anche alla luce di questi dati, ne consegue che in Italia il latte è il principale prodotto dell'allevamento della pecora, il quale viene quasi

completamente utilizzato per la trasformazione casearia (Bittante et al., 2005); nel 2010 in Italia sono state prodotte circa 88 mila tonnellate di formaggio ovino (FAO, 2010).

La produzione di latte di pecora è concentrata soprattutto in Sardegna, che da sola fornisce circa il 40% del totale nazionale (Bittante et al, 2005), seguita da Lazio (14%), Toscana (11%), Sicilia (9%) e Puglia (6%). Questo dato è il riflesso della situazione nazionale dell'allevamento ovino, che risulta molto diversificato fra le varie aree del Paese. Infatti, l'allevamento ovino, così come quello caprino, è legato soprattutto allo sfruttamento delle aree più aride e impervie (Bittante et al, 2005). Secondo i dati dell'anagrafe zootecnica dell'Istituto Zooprofilattico di Teramo (IZS, 2012), la Sardegna conta da sola più di un terzo del patrimonio ovino nazionale (circa 3,3 milioni di animali). L'Italia insulare (Sicilia e Sardegna) assomma oltre la metà degli ovini allevati, mentre il restante patrimonio zootecnico appartiene alle Regioni del Centro (circa il 25%), del Sud (meno del 15%) e in minima parte del Nord (6%).

In Italia sono allevate diverse razze ufficialmente riconosciute, con differenti attitudini produttive (carne, latte e a duplice attitudine carne e lana), più una serie di razze e popolazioni di in numero limitato, che allo stato attuale rivestono esclusivamente un interesse locale (Bittante et al, 2005). Le razze da latte in generale rappresentano la maggior

parte del patrimonio ovino nazionale, ulteriore conferma di quanto nel nostro Paese sia sempre stata presente una grande attenzione per la selezione alla produzione di latte.

Le razze da carne italiane riconosciute sono (ASSONAPA, 2012):

- Bergamasca;
- Biellese;
- Appenninica;
- Fabrianese;
- Laticauda;
- Barbaresca.

Le razze italiane da latte:

- Delle Langhe;
- Massese;
- Altamurana;
- Leccese;
- Comisana;
- Sarda;
- Valle del Belice;
- Pinzirita.

Razze italiane a duplice attitudine:

- Gentile di Puglia;
- Sopravissana;

- Merinizzata Italiana.

Da un punto di vista numerico, le principali razze allevate in Italia sono la Sarda e la Comisana, originaria della Sicilia. Sono entrambe ad attitudine lattifera e nessun'altra razza allevata in Italia raggiunge tali consistenze.

Nelle razze italiane da latte sono stati introdotti i programmi di miglioramento genetico negli anni 60 del secolo scorso. Lo schema più efficiente di selezione per le razze da latte è basato su un sistema piramidale, dove al vertice sono presenti le greggi iscritte al libro genealogico, delle quali vengono registrate le produzioni latte, condotti programmi di inseminazione artificiale o di monta naturale programmata e infine stimato il breeding value. Il progresso genetico viene quindi trasferito alle altre greggi commerciali attraverso l'inseminazione artificiale o con la monta naturale degli arieti selezionati. L'obiettivo di selezione per la maggior parte delle razze è tuttora rappresentato dell'incremento della produzione latte. Poiché quasi tutto il latte è destinato alla produzione di formaggio, molto importanti sono anche i parametri qualitativi e quantitativi. Inoltre, altri parametri d'interesse sono: morfologia della mammella e attitudine alla mungitura meccanica, resistenza alle malattie (mastite, parassiti intestinali, Scrapie) e parametri di interesse nutrizionale per il consumatore, come la composizione del profilo degli acidi grassi. I

programmi di miglioramento genetico basati sul tradizionale approccio quantitativo hanno ottenuto apprezzabili risultati in termini produttivi (Carta et al., 2009).

Negli ultimi anni si stanno studiando schemi di selezione basati sulla biologia molecolare, che potrebbero dare un contributo di miglioramento sia ai parametri selettivi tradizionali, sia ad altri nuovi, di difficile attuazione per gli alti costi di registrazione. Attualmente la strategia più efficace appare essere quella di concentrare gli sforzi sulla ricerca di mutazioni casuali nei geni che influenzano i parametri di importanza economica (Carta et al., 2009).

La pecora di razza Sarda

La pecora di razza Sarda (Figura 1), con una consistenza di oltre 4 milioni di capi solo in Italia, è la razza ovina italiana più numerosa. Originaria della Sardegna, si è gradualmente diffusa nelle altre regioni italiane, in particolare in Lazio, Umbria e Toscana, e attualmente si sta espandendo anche in altri Paesi dell'Area Mediterranea (Carcangiu & Vacca, 2005). Si tratta di una razza autoctona, presente in Sardegna probabilmente da millenni, che condivide le proprie origini con numerose razze mediterranee (Chessa et al., 2009).



Figura 1 Pecora di razza Sarda

Diffusa in origine esclusivamente nelle aree collinari, oggi è allevata praticamente in tutte le aree dell'isola, comprese le pianure irrigue, dove, a causa delle migliori condizioni di allevamento, si raggiungono livelli produttivi superiori alla media (Carcangiu & Vacca, 2005).

In Sardegna sono presenti circa 15 mila aziende ovine, che allevano in media poco più di 200 capi. La consistenza media del gregge e quindi la dimensione dell'azienda, tuttavia, varia da zona a zona. Infatti, se le dimensioni aziendali delle province di Cagliari e Nuoro si attestano sulla media regionale, nella provincia di Sassari (dove sono allevati circa un terzo degli animali totali dell'isola) la media sale a 243; invece, nella provincia di Oristano la dimensione media aziendale scende a circa 170 capi (IZS, 2012).

Il sistema di allevamento più diffuso è quello brado e semibrado, basato sullo sfruttamento del pascolo naturale.

La produzione principale della pecora Sarda è il latte. La produzione della carne, costituita dagli animali a fine carriera e dall'agnello da latte, macellato ad un peso vivo di 8/10 kg, rappresenta un prodotto di importanza marginale, così come la produzione della lana.

In passato, fino agli inizi del secolo scorso, vennero tentati incroci con pecore di altre razze, con lo scopo di aumentare la taglia e migliorare le caratteristiche del vello. Tuttavia queste immissioni di sangue non ebbero tuttavia molto successo, poiché, essendo tali razze in genere dotate di scarsa attitudine lattifera, con l'incrocio si diminuiva la produzione di latte, che invece era considerato il prodotto più importante dell'allevamento.

Inoltre, nei primi anni del secolo scorso in provincia di Cagliari vennero effettuati incroci con arieti di provenienza siciliana, ma di probabile origine maltese. Nei primi anni 70 presso l'allora Istituto Zootecnico Caseario della Sardegna, ora confluito in AGRIS (Agenzia per la Ricerca in Agricoltura della Regione Autonoma della Sardegna), sono stati effettuati incroci fra arieti di razza Frisona e pecore indigene (Sanna et al., 2001). Allo stato attuale non è facile precisare quale importanza abbiano avuto nella formazione della razza Sarda questi apporti di sangue dall'esterno, tuttavia in molte greggi si

possono tuttora osservare differenze morfologiche, pur rimanendo nell'ambito della stessa razza (figura 2).



Figura 2 Ovini di razza Sarda

Il miglioramento genetico della razza Sarda si realizza attraverso l'istituzione del Libro Genealogico, avvenuta nel 1928, e con i conseguenti controlli funzionali. Attualmente sono iscritti al libro genealogico 266310 capi e 2591 aziende (ASSONAPA, 2008), rispettivamente l'8% e il 16% del totale in Sardegna. A livello nazionale questo dato rappresenta il 50% degli ovini iscritti a libro genealogico.

Quello della razza Sarda è un libro aperto, al quale possono essere iscritti anche soggetti non nati in selezione, purché in possesso di determinati requisiti. Dato che l'obiettivo principale della selezione è il miglioramento dell'attitudine lattifera, tutte le pecore iscritte

vengono sottoposte al controllo della produzione del latte, effettuato con frequenza mensile per tutta la durata della lattazione. Viene preso inoltre in considerazione anche il miglioramento della composizione del latte, con particolare riguardo al contenuto in grasso ed in proteine. Secondo lo standard di razza, la pecora Sarda viene descritta come una razza di taglia media (circa 71 e 63 cm al garrese e 59 e 42 kg di peso, rispettivamente per maschio e femmina), con vello bianco, aperto, esteso fino a metà dell'avambraccio e poco sopra il garretto. La pelle deve essere sottile, elastica e di colore bianco rosato, talora con lieve picchiettatura nera o marrone sulla testa, negli arti e, in genere, nelle parti prive di lana. Presenta una testa distinta e leggera, solitamente un po' allungata con profilo diritto o leggermente convesso (montonino) nei maschi, faccia uniformemente bianca con espressione vivace, occhi grandi e vivaci con leggero rigonfiamento palpebrale; narici larghe, bocca ampia; orecchie di media grandezza o piccole, mobili, portate orizzontalmente e talvolta anche un po' pendenti; corna assenti nelle femmine o poco sviluppate, assenti o rudimentali nei maschi. Il collo è ben unito alle spalle ed al petto, lungo ed esile nelle femmine, più forte e più robusto nei maschi. Il tronco è allungato e di forma tronco-conica; il garrese ben serrato, leggermente pronunciato e piuttosto affilato nella pecora, più muscoloso nell'ariete; il torace è profondo e leggermente piatto, le spalle ben attaccate, leggere,

giustamente inclinate ed in armonia con le regioni circostanti; il dorso forte e diritto; la linea superiore corretta; i lombi larghi e robusti, allineati con il dorso; il ventre capace, arrotondato e ben modellato; i fianchi pieni, larghi e profondi; la groppa leggermente spiovente, più lunga che larga; la coscia piatta, scarna e ben discesa; la coda esile e lunga. La mammella è sferica, larga, ben sostenuta, forte negli attacchi; con tessitura morbida, spugnosa, elastica e quasi floscia dopo la mungitura; bene irrorata dalla corrente sanguigna periferica, con capezzoli proporzionati e ben diretti.

I caratteri riproduttivi propri della razza Sarda sono:

- fertilità annua (intesa come rapporto percentuale tra il numero delle pecore partorite ed il numero delle pecore matricine): 96%;
- prolificità (intesa come rapporto percentuale tra gli agnelli nati ed il numero delle pecore partorite) da 110% (in condizioni estensive) a 150% (in condizioni intensive);
- fecondità annua (intesa come rapporto percentuale tra gli agnelli nati ed il numero delle pecore matricine): da 106% (condizioni estensive) a 144% (in condizioni intensive).

Per quanto riguarda i caratteri produttivi, sempre secondo lo standard di razza, si valutano:

- la produzione di latte (produzioni medie di razza al netto del latte poppato dall'agnello): le primipare producono in media 60 litri in allevamento estensivo e 130 litri in allevamento intensivo in 100 giorni di lattazione; le secondipare rispettivamente 90 e 170 litri in 180 giorni; le pluripare 100 e 180 litri in 180 giorni.
- La percentuale media di grasso nel latte durante la lattazione è del 6,0%; percentuale media di proteine è del 5,3%.

Per quanto concerne invece la produzione di carne, gli agnelli nascono a un peso di circa 3,5-3,8 kg (rispettivamente per maschio e femmina), e 3,1-3,3 in caso di parto gemellare; il peso di 10 kg viene raggiunto all'età di un mese, qualche giorno dopo in caso di gemelli.

La lana, come abbiamo già visto, è di qualità grossolana; adatta più che altro per tappeti e materassi. La produzione media è di 2,5 kg annui nell'ariete e di 1,1 kg nella pecora.

Gli indirizzi di miglioramento, come già detto, sono rivolti ad esaltare l'attitudine alla produzione del latte sotto l'aspetto quantitativo e qualitativo; a migliorare le caratteristiche della mammella per facilitare la mungitura; ad incrementare la prolificità. Nella scelta dei riproduttori, difetti tollerabili sono la presenza nel vello di pelo morto, la presenza di ciuffo di lana sulla fronte, la presenza di corna nelle femmine e di corna rudimentali nei maschi; difetti da eliminare,

invece, sono la lana merinizzata, il vello nero o marrone, la groppa eccessivamente spiovente, la scarsa fecondità, la difficoltà alla mungitura.

Per poter essere ammessi all'azione selettiva, i soggetti di razza Sarda devono soddisfare dei requisiti minimi, e cioè: presentare i caratteri esteriori tipici della razza; raggiungere il punteggio minimo in una scheda di valutazione morfologica, dove vengono assegnati dei punteggi alle caratteristiche di razza, alla conformazione, allo sviluppo e alla mole, alle caratteristiche attitudinali; inoltre, devono raggiungere produzioni minime di latte in almeno una lattazione ufficialmente controllata, e cioè di 80 litri in 100 giorni nelle primipare, 160 litri in 180 giorni nelle secondipare, 180 litri in 180 giorni nelle pluripare.

Per quanto riguarda l'iscrizione al libro genealogico, gli arieti in possesso dei requisiti stabiliti dalla Commissione Tecnica Centrale del Libro Genealogico delle razze ovine, su proposta del Comitato di razza, sono iscritti al Registro Genealogico degli Arieti, dove vengono inseriti i maschi che abbiano raggiunto l'età minima di 8 mesi e siano provenienti dal Registro Genealogico del Giovane Bestiame. Il Registro Genealogico degli Arieti consta di tre Sezioni denominate A, B e C. Nella Sezione A vengono iscritti gli arieti definitivamente iscritti al registro Genealogico Giovane Bestiame, che abbiano

riportato nella valutazione morfologica almeno 60 punti su un massimo di 100. Nella sezione B vengono iscritti gli arieti provenienti dal Registro Genealogico del Giovane Bestiame che hanno riportato 70 punti nella valutazione morfologica, dei quali sono note almeno due generazioni ed essere figli di pecore in possesso dei requisiti per il Registro Genealogico Avanzato che abbiano raggiunto i minimi di produzione richiesti in una lattazione successiva alla prima. Nella sezione C sono iscritti gli arieti miglioratori cioè gli arieti provenienti dal Registro Genealogico Giovane Bestiame, con esito positivo della prova di progenie attuata secondo le norme fissate dalla Commissione Tecnica Centrale, su proposta del Comitato di Razza.

Al Registro Genealogico delle Pecore sono iscritti i soggetti provenienti dal Registro Genealogico del Giovane Bestiame ed in possesso dei requisiti morfologici, funzionali e genealogici individuali stabiliti dalla Commissione Tecnica Centrale del Libro Genealogico delle razze ovine su proposta del Comitato di Razza. Il registro delle pecore può essere ordinario o avanzato. Nel registro ordinario vengono iscritte le pecore che abbiano partorito almeno una volta, di ascendenza sconosciuta purché abbiano riportato nella valutazione morfologica almeno 60 punti e abbiano prodotto, se primipare, almeno 80 litri di latte in 100 giorni di una lattazione standard ufficialmente controllata (dal 31mo al 130mo giorno dal parto), oppure 160 e 180

litri in 180 giorni (dal 31mo al 210mo giorno dal parto) rispettivamente per secondipare e pluripare.

Al Registro Genealogico Pecore Avanzato vengono iscritte le pecore già iscritte nel Registro Genealogico Ordinario in possesso di ulteriori requisiti genealogici, morfologici e funzionali. Tali requisiti genealogici sono:

- due generazioni di ascendenti note oppure una generazione purché la madre sia in possesso dei requisiti funzionali per l'iscrizione al Libro Genealogico Avanzato;
- requisiti morfologici: aver riportato nella valutazione morfologica almeno 70 punti, con non meno di 40 nel giudizio sulle Caratteristiche Attitudinali, cioè nella valutazione dell'apparato mammario;
- requisiti funzionali: se primipare, aver prodotto almeno 130 litri di latte in 100 giorni di una lattazione standard ufficialmente controllata (dal 31mo al 130mo giorno dal parto) con 5,8% di grasso e 5% di proteine, oppure 220 e 250 litri in 180 giorni (dal 31mo al 210mo giorno dal parto) con 6% di grasso e 5,3% di proteine rispettivamente per secondipare e pluripare.

Al Registro Genealogico del Giovane Bestiame sono iscritti, alla nascita, i soggetti di sesso femminile nati negli allevamenti del Libro

Genealogico ed in quelli sottoposti ai Controlli Funzionali e discendenti da padre con requisiti richiesti per l'iscrizione alla Sezione B del Registro Genealogico Arieti e madre con i requisiti richiesti per l'iscrizione al Libro Genealogico Pecore ordinario o avanzato. Come abbiamo visto, possono essere iscritte in via provvisoria anche le agnelle con ascendenza paterna sconosciuta. Le stesse potranno essere iscritte al Registro Genealogico Pecore Ordinario solo nel caso che raggiungano i minimi produttivi richiesti per l'iscrizione.

Sono iscritti inoltre i maschi nati negli allevamenti del Libro Genealogico ed in quelli sottoposti ai Controlli Funzionali e discendenti da:

- padre con i requisiti richiesti per l'iscrizione alla Sezione B del Registro Genealogico Arieti;
- madre con i requisiti previsti per l'iscrizione al Registro Genealogico Pecore ordinario o avanzato in possesso dei seguenti requisiti: se primipare, aver prodotto almeno 100 litri di latte in 100 giorni di una lattazione standard ufficialmente controllata (dal 31mo al 130mo giorno dal parto), oppure 200 e 220 litri in 180 giorni (dal 31mo al 210mo giorno dal parto) con 6% di grasso e 5,3% di proteine rispettivamente per secondipare e pluripare.

Gli animali registrati provvisoriamente sono eliminati dal registro nel caso in cui la madre non ottenga l'iscrizione o non raggiunga i minimi entro le lattazioni standard sopracitate.

Fra i prodotti derivati dalla pecora sarda si annoverano tre formaggi DOP: il Pecorino Romano (reg. CE 1107/1996), il Pecorino Sardo e il Fiore Sardo (reg. CE 1263/1996); inoltre anche l'agnello di Sardegna è inserito nei prodotti IGP (reg. CE 138/2001).

Il ciclo produttivo della pecora di razza Sarda

Il ciclo produttivo della pecora è influenzato da fattori fisiologici e da fattori ambientali. Ciò che condiziona la data del parto, e quindi l'instaurarsi della lattazione, è infatti la fase fondamentale della riproduzione.

Fisiologicamente la pecora, come del resto anche altre specie, ha sviluppato un ciclo sessuale sincrono con le variazioni climatiche stagionali (Carcangiu & Vacca, 2005). Tale andamento determina la nascita dell'agnello in un periodo dell'anno dove le temperature ideali e la maggiore disponibilità di cibo consentono una più alta possibilità di sopravvivenza e di sviluppo del neonato, attraverso una migliore produzione latte della madre. Il fattore che consente questa sincronia è fondamentalmente legato al fotoperiodo. Gli ovini sono infatti una

specie nella quale il fotoperiodo decrescente determina l'inizio dell'attività sessuale. Questo fenomeno è particolarmente marcato alle alte latitudini, dove si hanno ampie variazioni del rapporto ore di luce/ore di buio durante l'anno: a queste latitudini, nei periodi di giorni lunghi, le femmine presentano un lungo periodo di anaestro e i maschi scarsa libido e scadimento della qualità del seme. Invece, a latitudini inferiori, questa stagionalità è meno marcata e il periodo di anaestro è decisamente più breve (circa 50 giorni) (Chemineau et al., 1995); nelle zone subtropicali l'attività sessuale è praticamente continua, poiché il fotoperiodo è pressoché costante. Il meccanismo che determina questo fenomeno è essenzialmente di tipo neuro-endocrino, che schematicamente può essere riassunto così: il segnale luminoso percepito dalla retina viene tradotto in impulso nervoso che stimola i pituitari dell'epifisi a secernere la melatonina, la quale a sua volta stimola l'attività riproduttiva attraverso la liberazione di GnRH. Tale comportamento è essenziale per la conservazione della specie, ma è poco funzionale per gli animali in produzione zootecnica. Infatti, sebbene in alcune specie come i bovini e i suini l'addomesticamento ha portato alla scomparsa della stagionalità riproduttiva, negli ovini in parte è ancora presente, forse perché la tipologia di allevamento brado e semibrado espone gli animali alle stesse condizioni ambientali e alimentari che sono presenti in natura. Ciò determina uno sfruttamento

non ottimale della pecora da un punto di vista zootecnico, in quanto i parti in primavera consentono solo pochi mesi di lattazione, poiché in estate sopraggiungono le condizioni di alte temperature e di scarsità di pascolo che determinano un progressivo calo della produzione lattea fino all'asciutta. Nel corso degli ultimi decenni sono state migliorate le strategie che consentono di poter anticipare i parti all'autunno, e quindi aumentare di parecchi mesi la durata della lattazione. Importanti sono stati gli interventi di tipo manageriale, come ad esempio la costruzione di ricoveri adeguati e il miglioramento dell'alimentazione, fattori che in parte hanno determinato la riduzione del periodo anaestrale attraverso una minore sensibilità verso il fotoperiodo. Attraverso l'utilizzo del flushing in combinazione con il cosiddetto "effetto maschio" circa il 70% dei parti avviene in autunno, che è un buon risultato, ma non sempre in grado di soddisfare le esigenze dell'allevamento. Negli ultimi decenni sono stati quindi introdotti i trattamenti ormonali nell'allevamento ovino, anche allo scopo di sincronizzare i cicli, che è pratica necessaria in caso di inseminazione artificiale. I trattamenti ormonali più diffusi sono quelli che si basano sui derivati del progesterone, associati alla somministrazione di PMSG. Inoltre, negli ultimi anni si sta diffondendo la somministrazione di melatonina, sotto forma di impianti sottocutanei a lento rilascio, che consente di simulare le

condizioni fotoperiodiche del periodo di attività sessuale, con conseguente stimolo alla ripresa dell'attività sessuale.

Il ciclo produttivo dei pascoli è a sua volta condizionato dall'andamento climatico tipico del mediterraneo. L'alimentazione della pecora è basata quasi esclusivamente sul pascolo naturale, con l'integrazione di concentrati che vengono somministrati al momento della mungitura. La qualità del pascolo presenta nel corso dell'anno una variazione ciclica legata al succedersi delle stagioni. Nelle annate normali, dopo la pausa estiva, la ripresa vegetativa delle erbe comincia in settembre-ottobre con le prime piogge e lo sviluppo continua nel mese di novembre e nelle zone più calde anche nel mese di dicembre. In questo periodo l'erba non è abbondante, ma di regola è di buona qualità. In gennaio e febbraio, nelle zone interne ed in quelle ad altitudini elevate, lo sviluppo delle erbe subisce un rallentamento a causa delle basse temperature, per cui spesso si rende necessario il trasferimento del gregge in zone più calde. In primavera l'abbondanza delle precipitazioni e le temperature più miti favoriscono lo sviluppo rigoglioso dell'erba e gli animali hanno quindi a disposizione alimento abbondante e di miglior qualità. Nel mese di maggio ed ai primi di giugno le erbe completano il loro ciclo di sviluppo e si seccano al cessare delle precipitazioni. L'erba secca costituisce appunto l'unica risorsa alimentare del gregge durante la stagione estiva. Come si vede,

la disponibilità alimentare nel corso dell'anno non è tale da soddisfare sempre le esigenze nutritive degli animali. In particolare, nel periodo del tardo autunno e dell'inverno il deficit alimentare delle pecore è piuttosto elevato, e ancor più lo è nelle annate in cui le precipitazioni sono irregolari e scarse. Una tale situazione si riflette negativamente su tutte le produzioni, particolarmente su quella del latte. Nei mesi di gennaio e febbraio viene prodotto il 24% del latte, mentre il 50% viene prodotto nei mesi di aprile e maggio. La distribuzione irregolare della produzione di latte non permette quindi la massima efficienza produttiva delle aziende di produzione né delle industrie di trasformazione.

Di fatto, per le pecore adulte la stagione di monta comincia a maggio e termina a metà luglio, in modo che i parti avvengano in autunno, all'inizio della ripresa vegetativa dei pascoli, dopo la pausa estiva. La monta è libera, con 30/50 pecore per ariete. I maschi rimangono nel gregge fino all'inizio della stagione dei parti, comunque non oltre il mese di novembre. In genere circa il 90% delle pecore adulte partorisce entro dicembre, mentre le agnelle, che raggiungono la maturità sessuale alla fine dell'estate o nel primo autunno, vengono coperte tra ottobre e novembre e partoriscono quindi tra marzo e aprile. Ogni pecora, di regola, partorisce un solo agnello, ma non sono infrequenti le nascite gemellari. Gli agnelli destinati al macello

rimangono con la madre per circa un mese, fino a che non raggiungono un peso vivo di 8/10 kg. Gli agnelli destinati alla rimonta restano con la madre per circa due mesi e poi vengono svezzati. La mungitura inizia dopo la separazione dell'agnello, tra dicembre e gennaio, e termina a luglio.

La mungitura è ormai quasi esclusivamente meccanica, anche se sono ancora presenti piccole realtà dove si pratica la mungitura manuale. Normalmente si praticano due mungiture giornaliere fino al mese di giugno; nell'ultimo mese si effettua una mungitura al giorno o ogni due giorni.

La lattogenesi

La lattogenesi è un processo di differenziazione attraverso il quale le cellule alveolari mammarie acquistano la capacità di secernere il latte (Aguggini et al, 1998). Essa viene generalmente suddivisa in due stadi: nella prima fase si osservano le modificazioni citologiche ed enzimatiche che predispongono la mammella alla produzione del latte, mentre nella seconda si avvia la sintesi del secreto mammario.

Questo evento è regolato da stimoli ormonali di varia natura. La prolattina è considerata il fattore indispensabile per l'inizio della lattazione, ma non è l'unico, in quanto una serie di ormoni

intervengono nelle varie fasi della lattazione, con importanti differenze a seconda della specie.

In generale, il progesterone sembrerebbe avere un ruolo inibitorio sulla lattogenesi, in quanto limita la secrezione di prolattina. La caduta dei valori di tale ormone alla fine della gravidanza costituisce uno dei maggiori segnali per l'avvio alla sintesi del latte. Inoltre, esso inibisce la sintesi di α -lattoalbumina e di lattosio. L'assenza del lattosio impedisce il passaggio di acqua all'interno della cellula, inibendo così la secrezione di latte. Il progesterone riduce il sinergismo fra estrogeno e prolattina; in gravidanza il progesterone compete con i corticosteroidi per i siti attivi recettoriali presenti nel citoplasma delle cellule alveolari.

La somministrazione di estrogeni in animali in lattazione determina un leggero aumento della produzione: questo sembrerebbe un effetto indiretto, dovuto all'aumento della prolattina provocato dagli estrogeni.

Gli ormoni secreti dalla corticale del surrene svolgono una certa azione sulla sintesi di caseine, probabilmente attraverso l'amplificazione dell'azione della prolattina. Si è visto che il cortisolo in topi a metà gravidanza induce una differenziazione del reticolo endoplasmatico e dell'apparato del Golgi delle cellule alveolari, indispensabile ai fini dell'azione della prolattina. La rimozione

chirurgica della ghiandola surrenale riduce la produzione di latte, che può essere ripristinata attraverso la somministrazione esogena di ormoni corticali. Nei ruminanti, tuttavia, il ruolo di questi ormoni non è efficace come nelle specie da laboratorio; le dosi terapeutiche di tali ormoni determinano in genere un calo della produzione lattea.

Le concentrazioni degli ormoni tiroidei sono ridotte durante la lattazione; con l'aumentare della produzione lattea, queste concentrazioni si riducono ulteriormente. Si può quindi affermare che l'animale in lattazione si trova in uno stato di ipotiroidismo fisiologico.

La somministrazione esogena di insulina sopprime la lattazione, ma anche l'insufficienza insulinica determina calo della produzione lattea.

La concentrazione di insulina nel sangue è negativamente correlata con la produzione lattea, in quanto è bassa nella prima fase di lattazione e alta nell'ultima.

La lattazione nella maggior parte delle specie è caratterizzata da un'alta concentrazione serica di prolattina; una diminuzione di questo valore è associata con una diminuzione di produzione lattea (Cowie et al, 1980). La prolattina ha un ruolo fondamentale perché sblocca la sintesi delle caseine. La secrezione di prolattina è influenzata da una serie di fattori fra i quali la temperatura, il fotoperiodo e gli stimoli portati al capezzolo. Nella bovina le concentrazioni di prolattina nel

sangue sono positivamente correlate con la produzione lattea, ma i coefficienti risultano bassi. Nei ruminanti la quantità di prolattina libera diminuisce gradatamente col progredire della lattazione e quindi quest'ormone non appare fondamentale per il mantenimento della lattazione (Cowie et al, 1980); tuttavia anche in questa specie la presenza di prolattina è fondamentale in prossimità del parto, affinché possa iniziare la produzione di latte (Aguggini et al., 1998).

Il ruolo del lattogeno placentare è dubbia. Secondo alcuni autori l'ormone non partecipa in modo diretto alla montata lattea, scomparendo dal circolo ematico rapidamente dopo il parto, quando l'azione della prolattina è al suo massimo livello. Al contrario, in uno studio è stato sperimentato un incremento di produzione lattea di circa il 20-25% dovuto somministrazioni esogene di lattogeno placentare ricombinante in ovini (Leibovich et al., 2001).

Nei ruminanti il ruolo di mantenere la lattazione appare essere sostenuto dal GH, che tra l'altro risulta avere una struttura molto simile alla prolattina (Cowie et al., 1980). L'analogia della sequenza aminoacidica fra questi due ormoni si aggira intorno al 50% (Cunningham, 2006). La concentrazione serica di GH raggiunge i massimi livelli attorno al picco della curva di lattazione (Cowie et al., 1980). È stato dimostrato che la somministrazione esogena di GH aumenta la produzione lattea in molte specie di mammiferi, compresa

quella umana (Etherton & Bauman, 1998). Studi sperimentali hanno dimostrato un effetto del GH nella produzione di latte in tutti gli animali da reddito (suini, bovini, ovini e caprini). Gli incrementi sono in media del 10-15%, che possono salire ulteriormente se le condizioni di allevamento sono di alto livello (Etherton & Bauman, 1998). Dopo la somministrazione esogena, la produzione lattea incrementa gradualmente nei primi giorni, fino a raggiungere il massimo in una settimana. Se il trattamento viene sospeso, la produzione torna gradualmente ai livelli precedenti la somministrazione nel giro di pochi giorni; se invece il trattamento continua, la produzione di latte si mantiene costante. Non vengono alterate le caratteristiche tecnologiche poiché la composizione del latte prodotto non viene alterata né nei suoi costituenti fondamentali (grasso, proteine, lattosio), che aumentano in maniera pressoché proporzionale all'incremento di latte, né nelle percentuali di microelementi (minerali, vitamine). Per questo motivo negli Stati Uniti è diffuso l'utilizzo negli allevamenti di bovini da latte di GH esogeno, che viene commercializzato in formulazioni a lento rilascio da somministrare ogni 2 settimane. Alcuni studi sperimentali condotti nella pecora hanno messo in evidenza anche in questa specie un importante effetto del GH nella produzione lattea: la somministrazione di GH bovino (Fernandez et al., 1995) e GH ovino ricombinante

(Leibovich et al., 2001) nella specie ovina ha determinato drastici incrementi nella produzione lattea, fino al 50% in più rispetto al gruppo di controllo, determinando solo lievi decrementi percentuali della materia utile (grasso, proteine, lattosio) e senza alterare in alcun modo lo stato di salute della mammella. Il meccanismo d'azione con il quale quest'ormone interviene sulla lattogenesi, tuttavia, non è ancora chiarito. Non sono stati evidenziati recettori per il GH nelle cellule alveolari (Avallone et al., 2009). La concentrazione ematica di GH non subisce alcuna variazione durante la stimolazione del capezzolo; inoltre, nella fase involutiva della mammella la riduzione del suo livello circolante appare abbastanza modesta. In definitiva, sembrerebbe che l'azione del GH si espliciti in modo indiretto, attraverso la liberazione di IGF-I a livello epatico (Aguggini et al., 1998; Avallone et al., 2009). Tuttavia bisogna aggiungere che sono stati evidenziati recettori per il GH nello stroma mesenchimale della mammella, suggerendo così la possibilità di una produzione anche locale di IGF-I (Flint & Knight, 1997).

Le IGF (o somatomedine) sono peptidi che hanno una forte analogia strutturale e metabolica con l'insulina, infatti sono anche chiamate fattori di crescita insulino-simili (Aguggini et al., 1998). Si distinguono IGF-I e IGF-II; queste ultime hanno un'importanza biologica quasi esclusivamente nella vita fetale (Aguggini et al.,

1998). Invece le IGF-I sono secrete dal fegato sotto la stimolazione del GH e tramite il circolo ematico raggiungono la mammella e si legano a recettori presenti sulle cellule alveolari mammarie. La regolazione di questo fenomeno appare però abbastanza complesso. Nel tessuto mammario sono presenti anche altre molecole, chiamate IGFBP, in grado di legarsi elettivamente al fattore di crescita e di potenziarne o inibirne l'azione. Nei ruminanti l'incremento di IGF-I è correlato al periodo di rapida crescita del parenchima mammario; le IGF-I svolgono una potente azione mitogenetica, differenziativa e protettiva dall'apoptosi delle cellule alveolari mammarie. La maggiore o minore presenza delle IGFBP può determinare rispettivamente una diminuzione o un incremento dell'azione delle IGF sulle cellule mammarie. Inoltre, nella fase di involuzione mammaria i livelli di IGFBP sono molto più elevati, in quanto sembrerebbero essere coinvolte nei fenomeni di apoptosi (Avallone et al., 2009) .

Quindi il meccanismo d'azione può essere riassunto in questo modo: il GH determina la liberazione di IGF-I a livello epatico e a livello locale, mentre la prolattina determina un incremento dell'azione di questi fattori di crescita sopprimendo la sintesi di IGFBP da parte delle cellule alveolari e quindi limitando i fenomeni di apoptosi (Flint & Knight, 1997; Avallone et al., 2009). Esiste quindi un'azione combinata fra i due ormoni ipofisari.

Il GH: funzioni fisiologiche

Il GH (Growth Hormone), ormone della crescita o somatotropina, è un ormone proteico prodotto dalle cellule somatotrofe, acidofile, che costituiscono circa il 4-10% del peso dell'adenipofisi (Aguggini et al., 1998).

La somatotropina è costituita da una catena polipeptidica di 191 aminoacidi, più una catena ramificata che varia a seconda delle specie; sono tali differenze strutturali che rendono questa molecola specie specifica. Infatti, per esplicare l'azione biologica non è indispensabile l'intera molecola, bensì solo il nucleo attivo, il quale è attorniato da una complessa sequenza di aminoacidi, che le conferisce la specificità di specie (Avallone et al., 2009). La capacità del ratto di utilizzare il GH di altre classi e specie, ad eccezione di quello dei pesci, è dovuta al fatto che in questa specie sono presenti degli enzimi in grado di privare da qualsiasi molecola di GH le parti inattive (Avallone et al., 2009).

Il GH circola libero nel plasma; l'emivita varia da 20 a 50 minuti e viene inattivato dal fegato. La sua azione biologica è pressoché ubiquitaria, poiché si esplica sul metabolismo glucidico, proteico, lipidico e minerale; numerosi studi hanno dimostrato la sua

importanza nelle performance di crescita e, come abbiamo visto, anche nelle produzioni lattee in varie specie di animali domestici (Fernandez et al., 1995; Etherton & Bauman, 1998; Leibovich et al., 2001).

La regolazione della secrezione di GH è piuttosto complessa; in generale si può affermare che tutta l'attività dell'adenoipofisi è controllata dai fattori di rilascio (Releasing Hormones) ipotalamici, che sono riversati nel sistema portale che connette l'eminenza mediana dell'ipotalamo con l'ipofisi anteriore (Cunningham et al., 2006). Mentre i neuroni che compongono l'ipofisi posteriore o neuroipofisi sono influenzati direttamente da input nervosi provenienti dall'ipotalamo, la regolazione della secrezione degli ormoni dell'adenoipofisi è di tipo vascolare. Infatti, l'ipotalamo produce ormoni regolatori o ipofisiotropici, che sono trasportati e poi rilasciati all'interno dell'eminenza mediana. Questi ormoni regolatori successivamente passano attraverso il sistema venoso portale all'adenoipofisi, dove stimolano il rilascio dei vari ormoni. La sintesi degli ormoni regolatori adenoipofisari è controllata sia da input nervosi che ormonali a livello dell'ipotalamo. La sintesi di GH è regolata da due fattori ipotalamici: uno inibente, il GHIH (ormone inibente il GH) o più comunemente somatostatina e uno stimolante, GHRH (ormone rilasciante il GH) o somatoliberina. La somatostatina

è un peptide di 14 aminoacidi che oltre a inibire la sintesi di GH determina inibizione anche di TSH, prolattina, insulina, glucagone, secretina, gastrina, VIP e sulle secrezioni del pancreas esocrino. La somatoliberina, invece, è un polipeptide composto di 43 aminoacidi e ha un'azione rilasciante esclusiva sul GH. Le influenze ipotalamiche sulla secrezione del GH sono finemente regolate da una complessa varietà di fattori nervosi, metabolici e ormonali.

Tutti gli ormoni proteici dell'adenoipofisi sono regolati attraverso meccanismi di feedback.

La concentrazione ematica di GH è molto elevata nei neonati, mentre nei giovani, nei quali ha un'azione determinante ai fini dell'accrescimento, i livelli plasmatici non si discostano di molto da quelli dell'adulto.

Uno degli stimoli più efficaci ai fini della liberazione di GH è l'ipoglicemia, come anche la riduzione della disponibilità di acidi grassi e di altri nutrienti che si può verificare in caso di digiuno ma anche di malnutrizione o di malassorbimento. L'insulina, in virtù della sua azione ipoglicemizzante, stimola la liberazione di GH, mentre l'iperglicemia, i corticosteroidi ad alte dosi, gli acidi grassi e la deplezione proteica agiscono in senso inibente. Questo fenomeno viene sfruttato per la diagnosi di acromegalia; poiché la somministrazione orale o endovenosa di glucosio nei soggetti normali

abbassa i livelli ematici di GH, in caso di acromegalia invece ciò non si verifica. Nei ruminanti la diminuzione degli acidi grassi nel sangue è lo stimolo più importante alla secrezione del GH, considerando i parametri fisiologici nettamente inferiori della glicemia rispetto ai monogastrici.

Gli stress di varia natura determinano sempre un rilascio di somatotropina, attraverso il sistema α -adrenergico.

Il sonno profondo, mediato da stimoli serotoninergici, è associato a livelli di GH più alti; invece durante il sonno REM questo livello diminuisce.

Agonisti ed antagonisti delle amine biogene intervengono a livello ipotalamico influenzando la liberazione di somatostatina o somatoliberina. Invece gli agenti α -adrenergici, serotoninergici, dopaminergici provocano tutti il rilascio di GH. I fattori β -mimetici venivano utilizzati con scopo auxinico in alcune specie di interesse zootecnico in quanto stimolanti la liberazione di GH.

Altri fattori che determinano un aumento della secrezione di somatotropina sono gli stati febbrili e il lavoro muscolare. Fra gli stimoli inibenti invece ricordiamo, oltre a quelli già citati, l'ipotiroidismo e l'ipertiroidismo.

Un altro fattore che ha un ruolo nel rilascio di GH è regolato dal gene POU1F1, chiamato anche PIT-1 o GHF-1. Questo gene è infatti

espresso principalmente nell'ipofisi e la sua espressione è fondamentale per la normale differenziazione, lo sviluppo e la sopravvivenza di tre tipi cellulari dell'adenoipofisi, cioè delle cellule tireotrope, di quelle lattotrope e somatotrope. Inoltre, ha anche un ruolo di stimolo nella secrezione di TSH, prolattina e GH (Mura et al., 2012).

Il meccanismo d'azione del GH può essere diretto oppure indiretto, mediato dalle somatomedine (o fattori di crescita insulino-simili), che sono peptidi prodotti dal fegato ma non solo, in quanto anche i tessuti bersaglio del GH hanno la capacità di sintetizzare queste molecole. Le somatomedine sono infatti prodotte nel fegato, nelle cellule del Sertoli, nel polmone, nel rene, nel cervello e nell'intestino; probabilmente sono prodotte anche a livello muscolare e di tessuto emopoietico (Avallone et al., 2009). Hanno una struttura fortemente simile a quella dell'insulina, viaggiano nel torrente circolatorio legati a specifiche proteine vettrici, formando dei complessi IGF-BP (binding protein). Esistono diverse somatomedine e altre molecole simili, tuttavia le più importanti sono due, cioè l'IGF-I e l'IGF-II, quest'ultima presente in circolo soprattutto durante la vita fetale e nel neonato. Le somatomedine hanno un'attività endocrina, paracrina e autocrina; la loro emivita è di circa 4 ore e hanno diverse funzioni nei vari distretti dell'organismo:

- 1) Attività GH-simile nelle cartilagini, cioè stimolano l'incorporazione di solfato nel condroitinsolfato delle cellule cartilaginee;
- 2) Attività insulino-simile nei tessuti muscolare e adiposo, cioè promuovono l'anabolismo, la sintesi di acidi nucleici e di proteine;
- 3) Attività stimolante la liposintesi e l'utilizzazione del glucosio.

Oltre al GH, anche altri ormoni sembrano in grado di regolare la sintesi di IGF: anche ACTH, FSH, LH e TSH sembrano essere in grado di stimolare la produzione di somatomedine nei loro organi bersaglio; invece, glicocorticoidi ed estrogeni esercitano un'azione inibitoria. Sono stati dimostrati due diversi tipi di recettori per le somatomedine, localizzati sulla membrana delle cellule bersaglio. Il recettore per l'IGF-I mostra analogie strutturali e funzionali con il recettore per l'insulina, tanto che possono avvenire, ad alte concentrazioni, reazioni crociate con questi. Invece, i recettori per l'IGF-II non reagiscono con l'insulina. Le somatomedine hanno un'azione insulino simile ma soprattutto un'azione come fattore di crescita. Esse favoriscono la captazione degli aminoacidi e la sintesi di proteine, il trasporto e il metabolismo del glucosio; inoltre, inibiscono la lipolisi. Promuovono la proliferazione cellulare in tutti i distretti, la sintesi di DNA, la meiosi nell'oocita; hanno un ruolo nella

differenziazione cellulare di vari tessuti, compreso il sangue. In pratica, l'azione delle somatomedine dipende dallo stato funzionale delle cellule bersaglio: se esse si trovano in fase iperplastica, viene stimolata la proliferazione; se invece si trovano in fase ipertrofica o sono cellule mature prive di capacità rigenerativa, promuovono i processi anabolici, come le sintesi proteiche.

Il gene del GH ovino

Il GH gioca un ruolo fondamentale nella crescita e nello sviluppo di tutti gli animali, compresi quelli in produzione zootecnica, e nella produzione del latte dei ruminanti. Quindi, appare chiaro come il gene del GH sia ormai considerato un gene candidato in molte specie di animali da reddito. Le variazioni nucleotidiche che si riscontrano fra soggetto e soggetto di una stessa popolazione possono determinare delle variazioni sostanziali anche nelle produzioni, poiché possono riflettersi sulla proteina matura e quindi in una maggiore o minore attività. Diversi studi hanno investigato sull'eventuale effetto del polimorfismo di questo gene sulla produzione di latte nella bovina (Lagziel et al., 1996; Dybus et al., 2004) e nella capra (Malveiro et al., 2001; Marques et al., 2003). Allo stato attuale, tuttavia, pochi lavori

hanno indagato su questo aspetto nella specie ovina (Marques et al., 2006).

Nella pecora, il gene del GH (*ovine GH*, *oGH*), è localizzato nel cromosoma 11 (Ofir & Gootwine, 1997), è lungo circa 1,8 kb ed è costituito da 5 esoni e 4 introni. Nella maggior parte dei mammiferi il GH è codificato da un solo gene, ad eccezione dei primati superiori, compreso l'uomo, dove nel cromosoma 17 è presente un cluster di 5 copie di geni GH-simili (Wallis et al., 1998).

Nella pecora sono stati osservati due alleli che differiscono per il numero di copie del gene, chiamati Gh1 and Gh2; l'allele Gh1 contiene un'unica copia del gene *oGH*, denominata GH1, mentre nell'allele Gh2 sono presenti due copie del gene, denominate GH2-N e GH2-Z (Valinsky et al., 1990). L'allele Gh2 è maggiormente rappresentato nella specie ovina, essendo presente in circa il 90% delle razze studiate fino ad oggi. Ciò suggerisce un possibile vantaggio selettivo di questo allele (Marques et al., 2006). Il gene GH2-N è espresso nell'ipofisi (Gootwine et al., 1996), mentre GH2-Z è espresso nei trofoblasti della placenta (Lacroix et al., 1996).

Negli ovini esistono pertanto soggetti omozigoti per Gh1 o Gh2 che presentano rispettivamente due o quattro geni GH, e soggetti eterozigoti, portatori nel loro genoma sia di Gh1 che di Gh2, che possiedono quindi tre geni GH.

Sulla base dell'analisi di sequenze di pecore omozigoti per gli alleli Gh1 e Gh2, Ofir and Gootwine (1997) hanno dimostrato che all'interno dell'allele Gh1 la sequenza del gene GH1 è altamente conservata, mentre vi sono differenze nella sequenza fra le copie GH2-N e GH2-Z.

Fra le copie di geni GH2-N e GH2-Z è presente una regione cosiddetta "intercopy", che si estende per circa 3.5 kbp. Il sequenziamento di questa regione ha permesso di evidenziare la presenza di un tratto di DNA, localizzato nella regione 5'UTR di GH2-Z, che differenzia le copie GH1/GH2-N da GH2-Z, che ha permesso di allestire una specifica amplificazione mediante PCR (Marques et al., 2006). In figura 3 è rappresentato il gene GH ovino nelle sue due forme.

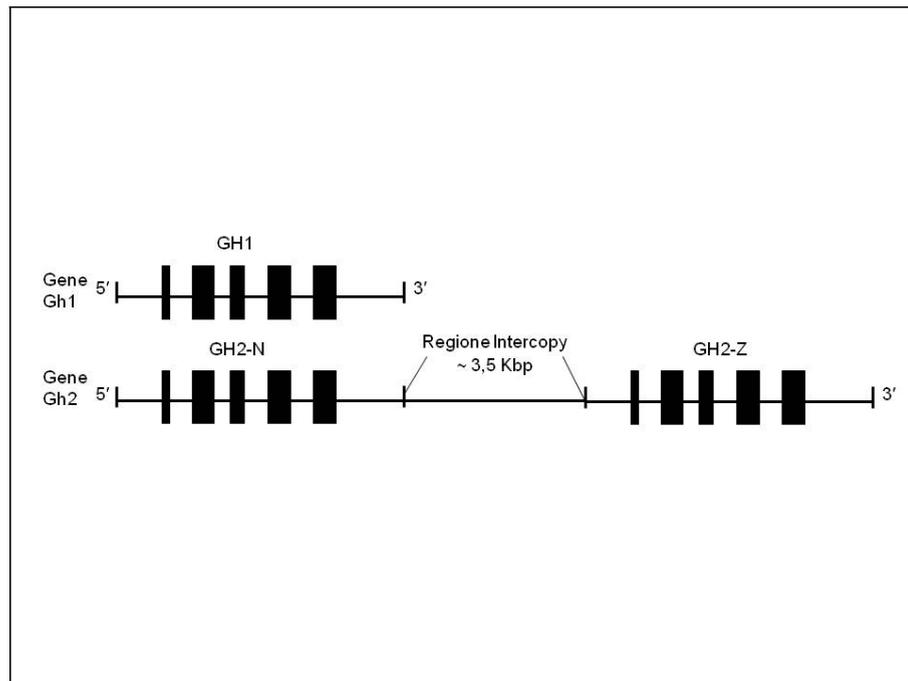


Figura 3 Rappresentazione schematica del gene *oGH*

Poiché la duplicazione del gene GH è presente solo nella pecora e nella capra, sembrerebbe che la duplicazione del gene si sia verificata nella sottofamiglia Caprinae solo dopo la divergenza evolutiva di questa dal resto della famiglia Bovidae. A ulteriore conferma di ciò, bisogna aggiungere il fatto che le copie di geni GH2-N e GH2-Z appaiono fra loro più simili, soprattutto nelle regioni non codificanti, di quanto non lo siano il gene GH1 (o GH2-N) con il GH bovino (Wallis et al., 1998).

Un aspetto ancora poco chiaro è la compresenza, sia nella pecora che nella capra, del polimorfismo allelico con la singola copia del gene, che è probabilmente quella ancestrale. In nessuna delle due specie

l'allele duplicato (Gh2) ha completamente sostituito quello corrispondente al gene singolo (Gh1). Sembrerebbe che i due geni GH nascano come conseguenza di un singolo evento di duplicazione del gene, precedente alla differenziazione evolutiva fra pecora e capra. Anche il polimorfismo allelico visto nella pecora e nella capra deve essere sorto prima della differenziazione fra queste due specie ed è stato sostenuto attraverso la speciazione e durante i successivi 5-7 milioni di anni; probabilmente è un vantaggio selettivo della forma eterozigote a determinare il mantenimento di queste due forme (Wallis et al., 1998).

2. Scopo

Scopo della ricerca

Abbiamo visto come la pecora di razza Sarda sia la razza ovina numericamente più importante in Italia; anche in termini produttivi: per le sue caratteristiche di rusticità e di alta produttività, la sua diffusione ormai non si arresta al solo territorio regionale, ma si spande anche in altre regioni italiane e straniere. Il suo allevamento è legato a una tradizione millenaria, ma negli ultimi decenni si è assistito a una serie di innovazioni di tipo genetico e gestionale che hanno contribuito a migliorare la produttività e l'efficienza; ulteriori miglioramenti in futuro potranno essere portati dall'applicazione delle biotecnologie.

Negli ultimi anni, infatti, sono stati condotti, e successivamente applicati con successo, diversi studi che studiavano l'effetto di alcuni geni sui parametri produttivi di animali di interesse zootecnico. Fra questi geni, hanno rivestito una grande importanza quelli che compongono il cosiddetto asse somatotropo.

In particolare, il GH (ormone della crescita) è ormai considerato un gene candidato per due fra i parametri zootecnici più importanti (crescita e sviluppo, produzione latte).

Nella vacca da latte questo gene è coinvolto nella crescita e nello sviluppo della ghiandola mammaria e ha un ruolo fondamentale nel mantenimento della lattazione; la somministrazione esogena di questo ormone causa drastici incrementi di latte. In letteratura sono riportati effetti del polimorfismo del gene del GH sulle produzioni latte nella specie bovina, in quella caprina e anche in quella ovina, sebbene siano presenti pochi lavori al riguardo.

Lo scopo della presente tesi di Dottorato è quindi quella di analizzare, mediante la tecnica Single Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) e il successivo sequenziamento, la variabilità genetica del gene di GH ovino (in entrambi gli alleli GH1/GH2-N e GH2-Z) in un campione di 200 pecore di razza Sarda, e verificare se vi siano eventuali associazioni con la produzione di latte e con la sua composizione.

3. Materiali e metodi

Materiali e metodi

Animali e campionamento. Gli animali utilizzati per la ricerca appartenevano a 4 distinti allevamenti situati in diverse zone della Sardegna: uno situato nel comune di Porto Torres (SS), uno nel comune di Cossoine (SS) e due nel comune di Sedilo (OR). Gli allevamenti erano accomunati da un sistema di allevamento di tipo semi-estensivo ed erano caratterizzati da elevati standard strutturali e gestionali.

Da ogni allevamento è stato estratto in maniera casuale un campione di 50 pecore di razza Sarda di età compresa fra i 4 e i 5 anni, pluripare (alla terza o quarta lattazione), in buono stato di salute e di nutrizione.

Ogni animale selezionato per la ricerca veniva identificato mediante un collare contenente un numero progressivo e da ognuno di essi veniva prelevato un campione di sangue intero utilizzando una provetta contenente EDTA.

Una volta al mese, da febbraio a giugno, da ogni pecora veniva registrata la produzione giornaliera di latte e veniva raccolto un campione di 50 ml di latte in un contenitore di plastica sterile, che veniva successivamente portato al laboratorio per le analisi.

Analisi sul latte. I campioni di latte erano trasportati al laboratorio

entro 2 ore a temperatura di +4 °C; qui veniva analizzato per contenuto di proteine totali e grassi mediante spettrofotometro a infrarosso (Milko-Scan 133B; Foss Electric, DK-3400 Hillerød, Denmark) in accordo con gli standard dell'International Dairy Federation (IDF 141C:2000) e per contenuto caseinico (FIL-IDF 29:1964).

Analisi del DNA. L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando un kit commerciale (NucleoSpin Blood, Macherey-Nagel); la concentrazione e la purezza del prodotto di estrazione venivano misurate mediante l'utilizzo dello spettrofotometro (Eppendorf Biophotometer, Hamburg, Germany). Il gene GH1/GH2-N è stato amplificato in maniera selettiva utilizzando la coppia di primer GHTF/GHTR (Marques et al, 2006) ottenendo un frammento di circa 2.05 kbp. Per poter amplificare l'allele GH2-Z è stata disegnata appositamente una coppia di primer utilizzando il software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), sulla base della sequenza depositata in banca dati (GenBank Acc. No. DQ461643), ottenendo un frammento di circa 2.22 kbp (Tabella 1).

La reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 25 µl, utilizzando 25-50 ng di DNA genomico; 4-16 pmol di ogni primer; 1,5 mM di MgCl₂; 200 µM di dNTPs, 1 U di Taq Platinum DNA Polimerasi (Invitrogen, Life Technologies). Il programma di PCR

consisteva in una denaturazione iniziale a 94 °C per 5 min, seguita da 35 cicli [94 °C (30 sec), 58 °C (20 sec), 72 °C (2 min)] e una fase di estensione finale a 72 °C per 5 min.

Le copie del gene GH1/GH2-N e GH2-Z sono state utilizzate separatamente come template per una nested PCR, con lo scopo di amplificare la regione 5'UTR (frammento I), gli esoni 1 – 5 (frammenti II - VI) e la regione 3'UTR (frammento VII), utilizzando i primer descritti da Marques et al. (2006). La coppia di primer GH2ZF/GH5PR è stata utilizzata per la nested PCR della regione 5'UTR del gene GH2-Z (frammento I, 358 bp).

I due frammenti I e II risultavano parzialmente sovrapposti, avendo in comune circa 60 bp; invece i frammenti VI and VII avevano in comune circa 87 bp.

I prodotti della nested PCR sono stati analizzati mediante *Single Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP). Le analisi sono state condotte attraverso l'utilizzo di un apparato per elettroforesi verticale D-Code Universal Mutation Detection System (BioRad) collegato ad un refrigeratore esterno, secondo il seguente protocollo: 4 µl di ogni prodotto di PCR erano uniti a 15 µl di soluzione denaturante (95% di formamide, 10mM NaOH, 0.05% di xylene-cianolo e 0.05% di blu di bromofenolo), sottoposti a denaturazione a 95 °C per 5 min, raffreddati su ghiaccio e caricati in gel di poliacrilamide al 10%

(acr/bis 29:1) con TBE 0.5×. Le condizioni di corsa erano le seguenti: temperatura costante di 12 °C, ad eccezione del frammento I di GH1/GH2-N che correva a 4 °C; potenza costante di 25W e da 4 a 6 ore di tempo di corsa. I diversi profili elettroforetici, previa colorazione con il colorante fluorescente Sybr-Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies) per 30 min, erano visualizzati utilizzando un transilluminatore UV (UVITEC, Cambridge).

Fra tutti i campioni analizzati, sono stati scelti per il sequenziamento da 1 a 3 campioni che avessero lo stesso profilo SSCP; i frammenti prescelti erano sequenziati nelle direzioni forward e reverse. Il sequenziamento è stato effettuato con un apparecchio Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), dopo aver purificato con il kit Agencourt® AMPure® (Beckman Coulter, USA).

I cromatogrammi relativi ai frammenti sequenziati sono stati visualizzati e verificati attraverso il programma Finch TV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.html>), mentre è stato utilizzato il programma BioEdit per allineare le sequenze (Hall, 1999). Le variazioni nucleotidiche sono state descritte seguendo le indicazioni della nomenclatura del Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). Le frequenze alleliche e l'equilibrio di Hardy-Weinberg sono stati determinati col software

POPGENE V1.32 14. (Yeh et al., 2000). La regione promotore è stata analizzata col software Alibaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2>), che utilizza il database TRANSFAC 7.0, per individuare i presunti siti di legame per fattori di trascrizione (TFBS). Gli aplotipi relativi alle regioni estreme delle diverse copie geniche sono stati predetti, sulla base del linkage disequilibrium e delle frequenze alleliche, all'interno di ogni copia di gene (GH1/GH2-N e GH2-Z) mediante il programma PHASE (Stephens et al, 2001).

Analisi statistica: L'analisi di associazione fra i genotipi di GH1/GH2-N e GH2-Z e i dati produttivi del latte è stata effettuata usando il software R (Version 2.10.0), con le misure ripetute GLM. I genotipi con frequenza <0.05 sono stati esclusi dall'elaborazione statistica. Il modello usato per tutte le variabili era:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_j + GS_{ij} + e_{k(ij)}$$

dove Y_{ijk} è la variabile, μ è la media, G_i è l'effetto random del genotipo ($i = 3$ per i frammenti II e VI di GH1/GH2-N; $i = 3$ per il frammento I e $i = 4$ per il frammento VI di GH2-Z), S_j è l'effetto fisso dello stadio di lattazione ($j = 5$), GS_{ij} è l'effetto dell'interazione e $e_{k(ij)}$ è l'effetto dell'errore. Per tutti i parametri l'effetto del modello veniva dichiarato significativo per $P < 0.05$. Il confronto multiplo delle medie è stato effettuato secondo il metodo di Bonferroni.

4. Risultati

Risultati

Le copie GH1/GH2-N e GH2-Z del gene GH ovino sono state amplificate separatamente, utilizzando il DNA genomico come template. Si sono così ottenuti due frammenti di DNA lunghi rispettivamente circa 2055 e 2219 paia di basi.

L'allele GH2-Z è stato amplificato in tutte le 200 pecore, fatto che dimostra l'assenza di genotipi omozigoti Gh1/Gh1 nella popolazione studiata. Tuttavia, non si può escludere la presenza di soggetti eterozigoti Gh1/Gh2.

Per poter studiare mediante la tecnica SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) la variabilità di sequenza dei diversi segmenti di DNA delle copie geniche GH1/GH2-N e di GH2-Z, è stata allestita una nested PCR: entrambe le copie del gene sono state utilizzate come template per un'ulteriore amplificazione. Le regioni studiate nella presente tesi sono: la regione 5'UTR (frammento I), gli esoni 1-5 (frammenti II-VI) e 3'UTR (frammento VII).

Analisi SSCP gene GH1/GH2N

Nelle figure 4-10 sono riportate le immagini dei diversi pattern SSCP relativi al gene GH1/GH2-N. I risultati sono inoltre riassunti nella tabella 2.

Tabella 2 Frequenza dei pattern SSCP e combinazioni genotipiche al gene GH1/GH2-N nella pecora di razza Sarda. I pattern SSCP sono stati identificati sulla base della conformazione dei singoli filamenti di DNA, mediante una lettera maiuscola (A, B, C, D, E), mentre i genotipi sono stati assegnati attraverso l'analisi della sequenza del DNA.

Frammento DNA	Frequenza dei pattern SSCP (%)	Combinazioni genotipiche	¹ Nt
I	A (94.5)	TT/GG	976/980
	B (5.0)	AT/AG	
	C (0.5)	AA/AA	
II	A (84.5)	CC/TT/GG	956/976/980
	B (5.0)	CC/AT/AG	
	C (10.0)	CT/TT/GG	
	D (0.5)	CC/AA/AA	
III	A (100)		
IV	A (85.92)	AA	1722
	B (13.56)	GA	
	C (0.50)	GG	
V	A (100)		
VI	A (69.5)	³ _ _ /GG	2655delT/2678
	B (15.0)	_ T/GT	
	C (14.5)	_ T/GG	
	D (0.5)	TT/GG	
	E (0.5)	TT/GT	
VII	A (69.5)	_ _ /GG	2655delT/2678
	B (15.0)	_ T/GT	
	C (14.5)	_ T/GG	
	D (0.5)	TT/GG	
	E (0.5)	TT/GT	

¹Nt: posizione nucleotidica relativa alla sequenza Acc. No. DQ450146;

²Nt: posizione nucleotidica relativa alla sequenza Acc. No. DQ461643;

³ _ : Delezione nucleotidica

Il frammento I, corrispondente alla regione 5'UTR, presentava tre diversi pattern: il più frequente risultava il pattern A, seguito dal B e dal C. Il sequenziamento ha rivelato che in questo frammento sono presenti due siti polimorfici (SNP, single nucleotide polymorphism) nelle posizioni 976/980 (DQ450146): i pattern A e C avevano combinazioni genotipiche omozigoti, mentre il pattern B (più raro nella popolazione analizzata) risultava eterozigote per entrambi gli SNP. Il pattern C era presente in un solo animale della popolazione studiata.

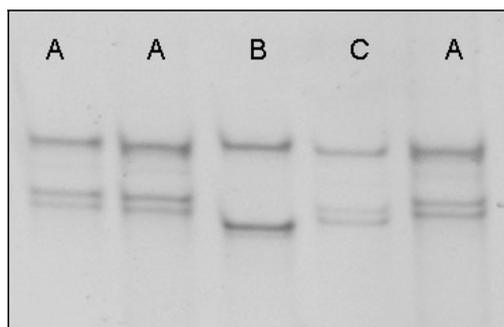


Figura 4 SSCP del frammento I del gene GH1/GH2-N

Il frammento II, contenente l'esone 1, mostrava quattro diversi pattern, il più frequente era il pattern A, seguito in ordine decrescente da C, B e D. Il sequenziamento ha dimostrato la presenza di tre SNP localizzati nei nucleotidi 956/976/980 (DQ450146): nei pattern A e D tali polimorfismi avevano combinazioni genotipiche omozigoti, mentre B e C erano eterozigoti. Gli SNP 976/980 sono rivelati sia dal

frammento I che dal II, infatti sono localizzati in una regione di DNA comune ad entrambi i frammenti di DNA.

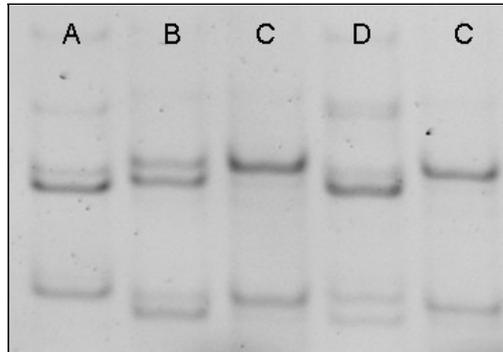


Figura 5 SSCP del frammento II del gene GH1/GH2-N

I frammenti III e V sono risultati monomorfici, mentre il frammento IV, che comprende il terzo esone delle copie geniche GH1/GH2N, presentava 3 pattern, il più frequente era A, seguito da B e C. Il polimorfismo era dovuto alla presenza di uno SNP in posizione 1722 (DQ450146), eterozigote nel pattern B.

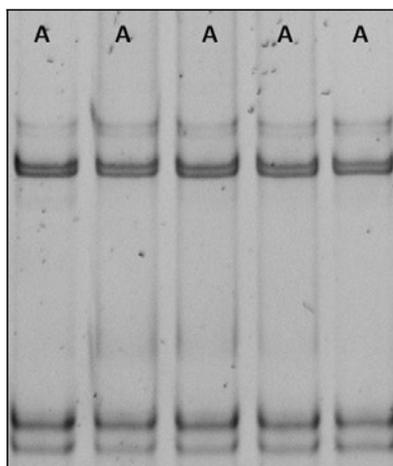


Figura 6 SSCP del frammento III del gene GH1/GH2-N

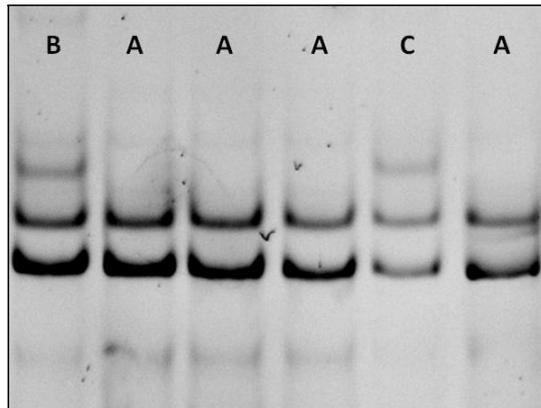


Figura 7 SSCP del frammento IV del gene GH1/GH2-N

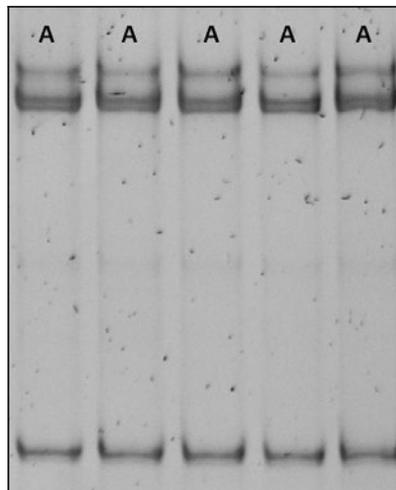


Figura 8 SSCP del frammento V del gene GH1/GH2-N

L'SSCP dei frammenti VI e VII si caratterizzava per la presenza di 5 pattern, con le medesime frequenze. Questo fatto è spiegato dal sequenziamento, che ha dimostrato la presenza di due SNP in entrambi i frammenti, in posizione 2655 e 2678 (DQ450146), situati nella regione che i due frammenti hanno in comune. Il sequenziamento ha rivelato che i pattern A e D avevano combinazioni genotipiche omozigoti.

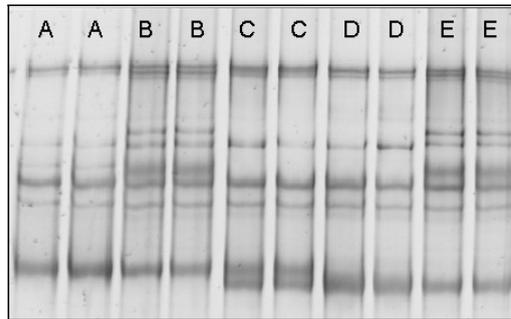


Figura 9 SSCP del frammento VI del gene GH1/GH2-N

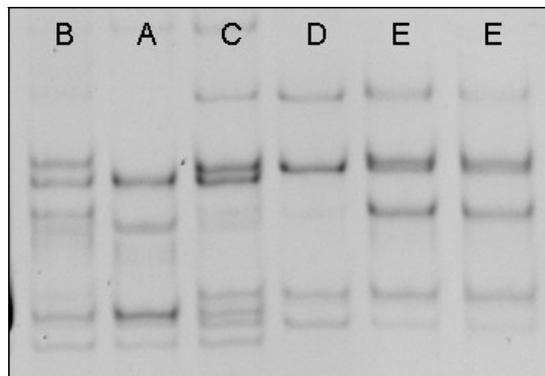


Figura 10 SSCP del frammento VII del gene GH1/GH2-N

Analisi SSCP gene GH2Z

Le figure 11-17 mostrano le immagini dell'analisi SSCP del gene GH2-Z; in tabella 3 sono riassunti i dati ottenuti con l'analisi elettroforetica.

Tabella 3 Frequenza dei pattern SSCP e combinazioni genotipiche al gene GH2-Z nella pecora di razza Sarda. I pattern SSCP sono stati identificati sulla base della conformazione dei singoli filamenti di DNA, mediante una lettera maiuscola (A, B, C, D, E), mentre i genotipi sono stati assegnati attraverso l'analisi della sequenza del DNA.

Frammento DNA	Frequenza dei pattern SSCP (%)	Combinazioni genotipiche	¹ Nt
I	A (39.5)	CC/CC	1130/1220
	B (43.5)	TC/GC	
	C (17.0)	TT/GG	
II	A (100)		
III	A (62.62)	GA/GG	1705/1715
	B (3.03)	GA/AA	
	C (16.16)	GG/GG	
	D (1.51)	GG/AA	
	E (11.11)	GA/GA	
	F (5.55)	GG/GA	
IV	A (35.85)	GA	2117
	B (60.10)	GG	
	C (4.04)	AA	
V	A (89.89)	GG	2455
	B (9.90)	GA	
	C (1.01)	AA	
VI	A (70.0)	GG/TT/_ _	2922/3035/3049ins3050
	B (24.0)	GG/TC/_ T	
	C (2.0)	GA/TC/_ T	
	D (3.5)	GG/CC/_ T	
	E (0.5)	AA/CC/TT	
VII	A (70.0)	_ _	3049ins3050
	B (29.5)	_ T	
	C (0.5)	TT	

¹Nt: posizione nucleotidica relativa alla sequenza Acc. No. DQ450146;

²Nt: posizione nucleotidica relativa alla sequenza Acc. No. DQ461643;

³_ : Delezione nucleotidica

Il frammento I di GH2-Z presentava tre diversi pattern. Il pattern più rappresentato era il B, seguito da A e C. Il sequenziamento ha mostrato che il pattern B aveva una combinazione genotipica eterozigote dei due SNP (situati in posizione 1130 e 1220, DQ461643), diversamente dagli altri due genotipi evidenziati, che invece erano omozigoti.

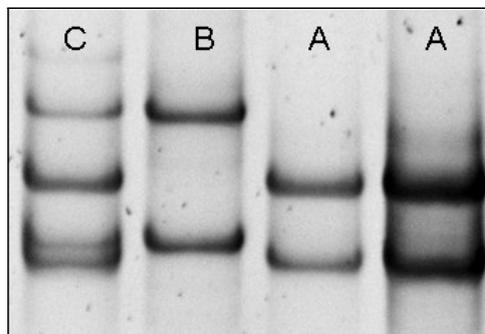


Figura 11 SSCP del frammento I del gene GH2-Z

Il frammento II era monomorfo, non presentando variazioni all'analisi SSCP dei soggetti analizzati.

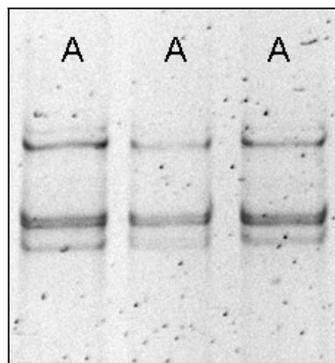


Figura 12 SSCP del frammento II del gene GH2-Z

Il frammento III presentava 6 pattern polimorfici, dovuti a differenti combinazioni genotipiche di due SNP, localizzati nelle posizioni nucleotidiche 1705/1715 (DQ461643). I pattern C e D erano omozigoti per entrambi gli SNP.

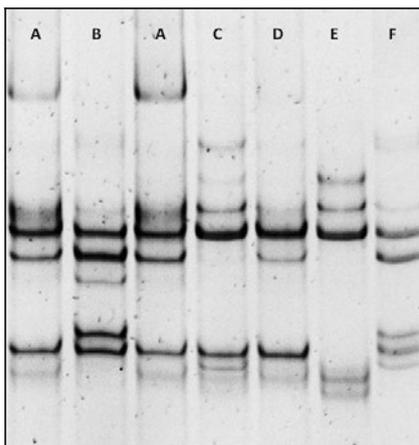


Figura 13 SSCP del frammento III del gene GH2-Z

Entrambi i frammenti IV e V presentavano 3 pattern polimorfici, il polimorfismo del frammento IV era dovuto ad uno SNP localizzato al nucleotide 2117 e quello del V alla variazione del nucleotide 2455 (DQ461643).

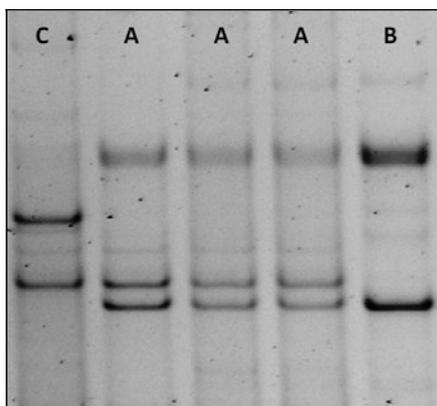


Figura 14 SSCP del frammento IV del gene GH2-Z

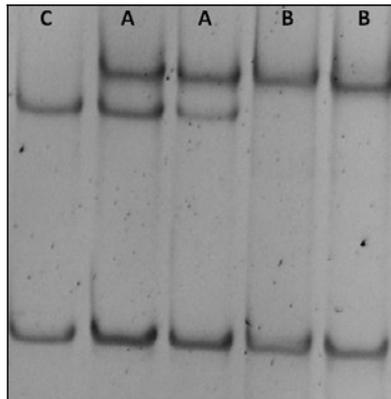


Figura 15 SSCP del frammento V del gene GH2-Z

Il frammento VI era caratterizzato dalla presenza di 5 diversi profili SSCP. Il sequenziamento ha stabilito che gli SNP in questo caso erano tre, in posizione 2922, 3035 e 3049 (DQ461643). Solo il pattern A (che risultava il più frequente) e il pattern E (il meno frequente) avevano combinazioni genotipiche omozigoti.

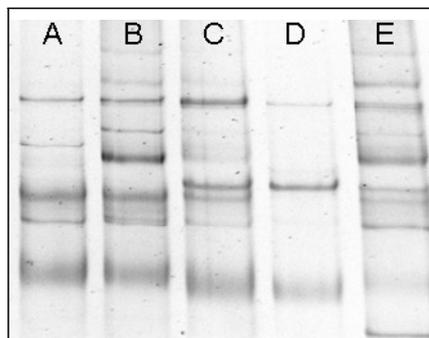


Figura 16 SSCP del frammento VI del gene GH2-Z

Il frammento VII mostrava tre diversi pattern, e il più frequente era A, seguito da B e da C; in questo tratto era presente un solo SNP, in posizione 3049 (DQ461643) (questo tratto si sovrapponeva con il frammento VI). Solo il pattern B era eterozigote.

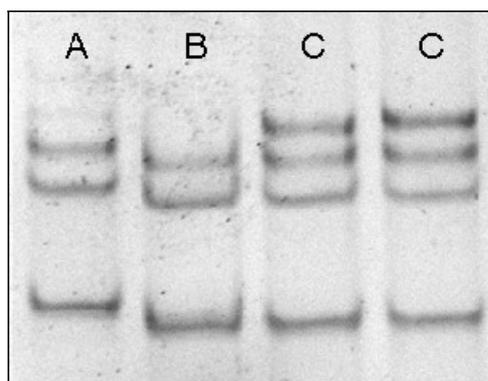


Figura 17 SSCP del frammento VII del gene GH2-Z

Analisi delle variazioni nucleotidiche

Gene GH1/GH2-N - Nella tabella 4 sono riassunte tutte le variazioni nucleotidiche rinvenute grazie al sequenziamento dei tratti presi in esame.

Tabella 4 Polimorfismi del gene GH1/GH2-N

Variazione nucleotidica	Nt. ¹	Localizzazione	Variazione aminoacidica	Frequenze alleliche
c.-39 C > T	956	5'UTR	-	0.048
c.-19 T > A	976	5'UTR	-	0.030
c.-15 G > A	980	5'UTR	-	0.030
c.255 G > A	1722	Exon-3	-	0.714
c.*30 del T	2655delT	3'UTR	-	0.843
c.*53 G > T	2678	3'UTR	-	0.076

¹ Posizione nucleotidica relativa alla sequenza di riferimento DQ450146

Nel gene GH1/GH2-N sono state trovate complessivamente sei variazioni nucleotidiche, tre nella regione 5'UTR, una nell'esone 3 e due nella regione 3'UTR, in base alla sequenza depositata in banca dati (acc. no. DQ450146).

Gli esoni 1, 2, 4 e 5 sono risultati monomorfici.

Le variazioni nucleotidiche rivelate rispetto alla sequenza di riferimento avevano delle basse frequenze, ad eccezione di c.255G>A (esone 3) e della delezione c.*30delT, che mostravano le frequenze 0.714 e 0.843, rispettivamente. tutte le variazioni nucleotidiche erano in equilibrio di Hardy-Weinberg per il locus GH1/GH2-N, ad eccezione di c.-19T>A e c.-15G>A.

Gene GH2-Z - Nel gene GH2-Z sono state rivelate complessivamente nove variazioni nucleotidiche, rispetto alla sequenza di riferimento DQ461643 (Tabella 5).

Tabella 5 Polimorfismi del gene GH2-Z

Variazione nucleotidica	Nt. ¹	Localizzazione	Variazione aminoacidica	Frequenze alleliche
c.-259 T > C	1130	5'UTR	-	0.611
c.-169 G > C	1220	5'UTR	-	0.611
c.29 G > A	1705	Exon-2	-	0.385
c.39 G > A	1715	Exon-2	Ala27Thr	0.133
c.255 G > A	2117	Exon-3	-	0.223
c.364 G > A	2455	Exon-4	Val122Ile	0.056
c.556 G > A	2922	Exon-5	p.Gly186Ser	0.015
c.*15 T > C	3035	3'UTR	-	0.168
c.*29_30insT	3049ins3050	3'UTR	-	0.151

¹Posizione nucleotidica relativa alla sequenza di riferimento DQ461643

Due variazioni erano localizzate nella regione 5'UTR, due nell'esone 2, delle quali una nonsinonima (c.39G>A), determinava la presunta sostituzione aminoacidica p.Ala27Thr. Una variazione nucleotidica era localizzata nell'esone 3 e ancora due nonsinonime: una nell'esone 4 (c.364G>A), determinava la presunta sostituzione aminoacidica p.Val122Ile e una nell'esone 5 (c.556G>A), determinava la presunta

sostituzione aminoacidica p.Gly186Ser. Infine due variazioni nucleotidiche erano localizzate nella regione in 3'UTR. L'esone 1 era monomorfo.

L'analisi delle frequenze alleliche ha stabilito che la variazione nucleotidica c.556G>A era rara, ed era l'unica variazione nucleotidica che non fosse in equilibrio di Hardy-Weinberg per questo locus.

Analisi aplotipi regioni 5' e 3'UTR

L'analisi degli aplotipi per il locus GH1/GH2-N è rappresentata nella tabella 6.

Tabella 6 Frequenze aplotipiche del gene GH1/GH2-N

Aplotipo ¹	GH1/GH2-N					Frequenza	S.E. ³
	c.-39 C > T	c.-19 T > A	c.-15 G > A	c.*30 del T	c.*53 G > T		
1	C	T	G	² -	G	0.830	0.003
2	C	T	G	T	G	0.063	0.002
3	T	T	G	T	T	0.037	0.001
4	C	T	G	T	T	0.029	0.002
5	C	A	A	T	G	0.017	0.001
6	C	A	A	T	T	0.010	0.001
7	T	T	G	-	G	0.010	0.002

¹Sono rappresentati solamente gli aplotipi con frequenza > 0.01 ; gli aplotipi con frequenze > 0.05 sono indicati in grassetto.

²- = delezione di un singolo nucleotide.

³S.E. = deviazione standard stimata delle frequenze.

Sette aplotipi avevano una frequenza maggiore di 0.01, e solo due mostravano una frequenza >0.05: l'aplotipo 1 (83%) e 2 (6,3%).

Al locus GH2-Z sono state stimate 6 combinazioni aplotipiche con una frequenza maggiore di 0.01, tre delle quali avevano frequenza >0.05, e cioè l'aplotipo 1 (60%), il 2 (23,2%) e il 3 (12,5%) (tabella 7).

Tabella 7 Frequenze aplotipiche del gene GH2-Z

Aplotipo ¹	c.-259 T > C	c.-169 G > C	c.556 G > A	c.*15 T > C	c.*29_30insT	Frequenza	D.S. ³
1	C	C	G	T	² -	0.600	0.003
2	T	G	G	T	-	0.232	0.003
3	T	G	G	C	T	0.125	0.003
4	T	G	G	C	-	0.018	0.000
5	T	G	A	C	T	0.015	0.001
6	C	C	G	C	T	0.010	0.003

¹Sono rappresentati solamente gli aplotipi con frequenza > 0.01 ; gli aplotipi con frequenze > 0.05 sono indicati in grassetto

² = delezione di un singolo nucleotide

³ S.E. = deviazione standard stimata (radice quadrata della varianza della distribuzione a posteriori) delle frequenze

Analisi delle correlazioni tra pattern SSCP e caratteri produttivi

Nella tabella 7 è riportato l'effetto del genotipo dei geni GH1/GH2-N e GH2-Z e dello stadio di lattazione sulla quantità di latte prodotto e sulla percentuale nel latte di grasso, proteine e caseine. L'analisi statistica è stata condotta prendendo in considerazione solo i frammenti II e VI del gene GH1/GH2-N e i frammenti I e VI di GH2-Z, poiché erano i più informativi.

Tabella 8 Analisi della varianza che mostra gli effetti del genotipo (G) e dello stadio di lattazione (S) sulle caratteristiche produttive del latte

	Valore di P							
	GH1/GH2-N				GH2-Z			
	Framm. II		Framm. VI		Framm. I		Framm. VI	
G	S	G	S	G	S	G	S	
Prod	0.054	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.226	0.000
Grasso	0.013	0.000	0.006	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000
Proteine	0.039	0.000	0.005	0.000	0.107	0.000	0.000	0.000
Caseine	0.030	0.000	0.008	0.000	0.130	0.000	0.000	0.000

Nella popolazione analizzata l'effetto dell'interazione genotipo×stadio di lattazione sui parametri produttivi del latte non era statisticamente significativo. Lo stadio di lattazione influenzava in maniera significativa ($P<0.001$) i caratteri produttivi presi in esame, come descritto in tabella.

Tabella 9 Medie ed errore standard (SEM) della produzione e composizione di latte, secondo i genotipi del gene GH1/GH2-N

Pattern SSCP	Frammento II				Frammento VI				
	A	B	C	SEM	A	B	C	SEM	
Pr latte	g	580.9 ^{b1}	596.8 ^b	526.0 ^a	18.79	565.2 ^A	586.0 ^A	628.2 ^B	17.27
Grasso	%	6.41 ^b	6.01 ^a	6.37 ^b	0.12	6.44 ^B	6.20 ^A	6.29 ^B	0.13
Proteine	%	5.90 ^a	5.73 ^a	5.96 ^b	0.05	5.93 ^B	5.89 ^B	5.76 ^A	0.50
Caseine	%	4.66 ^a	4.50 ^a	4.70 ^b	0.02	4.68 ^B	4.63 ^B	4.55 ^A	0.45

¹Lettere diverse nella stessa riga indicano i valori che differiscono in maniera significativa; A, B, C = $P < 0.01$; a, b, c = $P < 0.05$

L'analisi statistica ha stabilito che entrambe le copie del gene GH ovino influenzano l'espressione fenotipica dei parametri produttivi del latte. Prendendo in considerazione il gene GH1/GH2-N (tabella 9), gli animali che in SSCP avevano il profilo A e B del frammento II ($P<0.05$) e C del frammento VI ($P<0.01$) producevano una quantità di latte superiore. Gli animali che mostravano i pattern A e C del frammento II ($P<0.05$) e VI ($P<0.01$) producevano un latte con percentuale in grasso superiore. Il pattern C del frammento II ($P<0.05$), con i profili A e B del frammento VI ($P<0.01$) erano associati con i più alti contenuti in proteina e caseina.

Le associazioni statistiche delle variazioni del gene GH2-Z con i parametri produttivi sono riassunte nella tabella 10.

Tabella 10 Medie ed errore standard (SEM) della produzione e composizione di latte, secondo i genotipi del gene GH2-Z

Pattern SSCP	Frammento I				Frammento VI				SEM	
	A	B	C	SEM	A	B	C	D		
Pr latte	g	616.3 ^B	549.3 ^A	552.3 ^A	10.57	581.0	579.2	584.9	503.2	20.49
Grasso	%	6.45 ^b	6.38 ^b	6.21 ^a	0.07	6.42 ^B	6.29 ^B	5.60 ^A	6.75 ^C	0.14
Proteine	%	5.91	5.91	5.82	0.03	5.88 ^B	5.97 ^C	5.26 ^A	5.99 ^C	0.06
Caseine	%	4.67	4.66	4.59	0.48	4.64 ^B	4.70 ^C	4.24 ^A	4.73 ^C	0.05

¹Lettere diverse nella stessa riga indicano i valori che differiscono in maniera significativa; A, B, C = P < 0.01; a, b, c = P < 0.05

Il pattern A dell'SSCP del frammento I era statisticamente associato con la più alta produzione di latte (P<0.01). Gli animali che mostravano il profilo C del frammento I producevano il latte con la più bassa percentuale di grasso (P<0.05); anche il frammento VI influenzava la percentuale di grasso nel latte (P<0.01): i valori più alti erano associati con il pattern D, mentre i più bassi con il pattern C. Le più alte percentuali di proteine e caseine erano statisticamente associate con i profili B e D del frammento VI (P<0.01).

5. Discussione

Discussione

L'analisi separata delle due copie del gene GH ovino ha evidenziato delle nette differenze: il frammento II era monomorfo nell'allele GH2-Z, mentre mostrava 4 pattern in GH1/GH2-N; i frammenti III e V erano monomorfi in GH1/GH2-N e presentavano rispettivamente 6 e 3 pattern in GH2-Z; infine, il frammento VII aveva 3 profili SSCP in GH2-Z contro i 5 evidenziati in GH1/GH2-N.

Sia il gene GH1/GH2-N che GH2-Z mostravano un maggiore polimorfismo nei frammenti VI e VII (corrispondenti all'esone 5 e alla regione 3'UTR), rispetto ai frammenti I e II (regione promotore e esone 1), similmente a quanto riportato da Marques et al., (2006) in pecore di razza Serra da Estrela. Questo dato conferma i risultati di lavori precedenti, che affermavano che la regione 5'UTR e l'esone 1 fossero maggiormente conservati rispetto alle altre regioni, considerando l'allele GH1/GH2-N (Ofir & Gootwine, 1997).

Il sequenziamento dei soggetti che mostravano diversi profili SSCP ha permesso di allineare le regioni di DNA corrispondenti nei due geni GH1/GH2-N e GH2-Z. Il confronto fra questi ha evidenziato che la regione che differenzia il gene GH1/GH2-N da GH2-Z inizia 83 paia di basi (bp) a monte del codon di inizio della trascrizione (ATG, esone-1) e che tutte le variazioni nucleotidiche identificate erano

gene-specifiche, ad eccezione di c.255G>A (esone-3) e della inserzione/delezione (indel) nella regione 3'UTR, presenti in entrambe le copie del gene *oGH*.

Mutazioni nella regione promotore

La predizione del coinvolgimento delle variazioni nucleotidiche della regione promotore di GH1/GH2-N in potenziali siti di legame per fattori di trascrizione (Transcription Factor Binding Sites, TFBS) è stata realizzata attraverso il software Alibaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2>). Tale indagine ha rivelato che i due polimorfismi c.-19T>A e c.-15G>A producevano una variazione a seconda dell'aplotipo presente: la combinazione TG introduceva, ai nt -14/-23, un sito di legame per PEA3 (Polyoma Enhancer Activator 3), che risultava assente con l'aplotipo AA; mentre l'aplotipo AA introduceva, nella sequenza nucleotidica -17/-26, un potenziale sito di legame per il fattore di trascrizione Sp1 (Specificity Protein 1). La sottofamiglia di proteine PEA3 gioca un ruolo chiave nella regolazione dell'embriogenesi mammaria e nello sviluppo della mammella nel topo ma anche nella specie umana (Kurpios et al., 2003), mentre Sp1 è un fattore di trascrizione coinvolto in diversi aspetti del funzionamento delle cellule eucariote (Li et al., 2008).

Numerosi potenziali TFBS sono stati predetti nella regione promotore di GH2-Z. La presenza di una C nel sito polimorfico c.-259T>C determina la formazione di un sito di legame per il fattore di trascrizione C/EBP-alpha (CCAAT/Enhancer Binding Protein; nucleotidi -256/-265), mentre nel caso in cui la C veniva sostituita da una T questo potenziale sito di legame veniva perduto. Il fattore di trascrizione C/EBP-alpha è noto in quanto gioca un ruolo chiave nella regolazione dell'adipogenesi (Payne et al., 2009).

Riguardo invece al sito polimorfico c.-169G>C, la presenza di G era coinvolta nella formazione di un potenziale sito di legame per il fattore di trascrizione USF (Upstream Stimulatory Factor 1; nucleotidi -160/-169), che veniva perso in presenza della C. Nella specie umana il fattore di trascrizione USF1 è associato a iperlipidemia familiare combinata, ed è coinvolto nella regolazione di alcuni geni importanti nel metabolismo di lipidi e colesterolo (Rada-Iglesias et al., 2008). Inoltre, nella sequenza depositata in banca dati (acc. no. DQ461643; Marques et al., 2006) è riportato lo SNP c.-32T>C, al nucleotide 1357, che nella popolazione ovina oggetto di questa tesi era monomorfo per T. L'analisi della regione promotore ha svelato che il nucleotide c.-32T determina l'introduzione di diversi potenziali TFBS (C/EBPalp, c-Jun, CBP100, AP-1, GCN4 and c-Fos), che invece venivano tutti persi quando al suo posto era presente c.-32C.

Da questi dati si può osservare che all'interno di ciascun gene c'è una variabilità della regione promotore che potrebbe avere conseguenze sulla regolazione dell'espressione della relativa proteina.

Differenze tra le regioni promotore di GH1/GH2-N e GH2-Z

Le due regioni promotore analizzate condividevano un sito di legame per il fattore di trascrizione PEA3 ai nucleotidi -14/-23, e una regione (nt -81/-70) potenzialmente riconosciuta dai fattori di trascrizione GATA-1, Sp1 e AP-2. A monte del nucleotide -82 le sequenze dei due promotori e i relativi predetti TFBS differiscono completamente. Questo potrebbe spiegare l'espressione differenziale delle due copie geniche descritta da diversi Autori. Infatti, Lacroix et al. (1996) hanno descritto l'espressione di due forme di GH-mRNA nella placenta di pecora, una delle quali relativa al GH di origine ipofisaria e ritenuta il prodotto del gene GH1/GH2-N, la seconda, presente solo nella placenta, è stata attribuita al prodotto del gene GH2-Z. Gootwine et al., (1996) hanno confermato che GH2-Z non è espresso nell'ipofisi: questo potrebbe essere dovuto ad una regolazione dell'espressione genica differente rispetto a GH1/GH2-N.

Mutazioni negli esoni

L'esone 1 è risultato monomorfo sia nel gene GH1/GH2-N che in GH2-Z, così come riportato da Marques et al. (2006) nella pecora

portoghese di razza Serra da Estrela, suggerendo che tale regione è altamente conservata non solo all'interno di GH1 (Ofir & Gootwine, 1997), ma anche nelle copie GH2-N e GH2-Z.

Tre variazioni nucleotidiche nonsinonime sono state individuate nel gene GH2-Z; tali mutazioni sono state analizzate con i software Panther (Brunham et al., 2005) e PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010) al fine di predire potenziali conseguenze sulla funzione della proteina. L'analisi ha rivelato che le sostituzioni aminoacidiche Ala27Thr, localizzata nel peptide segnale, e Val122Ile, localizzata nella proteina matura, non determinano alcuna alterazione della funzionalità della proteina.

Per la sostituzione aminoacidica p.Gly186Ser, presente anche in pecore di razza Serra da Estrela (Marques et al., 2006), l'analisi con Panther e Polyphen-2 ha rivelato che probabilmente questa variazione non influenza la funzionalità della proteina finale.

Inoltre, l'analisi con il server NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) ha stabilito che le tre variazioni aa considerate non determinano aumento o perdita di siti di fosforilazione, mentre dall'analisi con Scansite (Obenauer et al., 2003), quando viene eseguita in condizioni di high stringency, è risultato che Ser186 può determinare l'introduzione di un potenziale

sito di fosforilazione PKC_μ a livello dei residui aminoacidici 179-193 della proteina.

Mutazioni nella regione 3'UTR

Nella regione 3'UTR sono state rinvenute diverse variazioni nucleotidiche, fra queste, solo una era comune a entrambi i geni GH1/GH2-N e GH2-Z: l'inserzione/delezione (indel) di una timina localizzata 30 paia di basi a valle dello stop codon (indicata come c.*30delT o c.*29_30insT in base alla sequenza di riferimento). Una indel polimorfica nella stessa posizione è stata riportata anche nel gene GH di capra (GenBank acc. no. GU355687-9), ma con una differenza essenziale: il nucleotide inserito/deleto è una citosina e non una timina. È interessante notare che nella stessa posizione del gene GH bovino è presente una citosina. Questo sito di mutazione, insieme con le mutazioni trovate in ciascuna copia del gene, potrebbe risultare un elemento utile per la filogenesi dei caprini.

Inoltre, le variazioni nucleotidiche rivelate nelle regioni non codificanti potrebbero influenzare la regolazione dell'espressione genica in seguito all'interazione con gli RNA non codificanti (Shimoni et al., 2007).

Influenza di alcuni pattern polimorfici sui caratteri produttivi

I valori quali - quantitativi del latte prodotto registrati nel corso della lattazione rientravano nella media della razza Sarda (http://www.assonapa.com/norme_ecc/ovini_llgg/sarda-ovina.htm) e le variazioni registrate seguivano l'andamento di una normale curva di lattazione.

Per l'analisi dell'associazione genotipica con i caratteri produttivi sono state considerate solo le regioni estreme delle due copie geniche GH1/GH2-N e GH2-Z, comprendenti i frammenti I, II, VI e VII.

Se si confrontano i dati produttivi con i profili SSCP del gene GH1/GH2-N, è interessante notare l'associazione del profilo A del frammento II e del profilo C del frammento VI con le maggiori produzioni di latte e contenuto in grasso. La combinazione di questi profili può essere attribuita agli aplotipi 1 e 2, che erano i più frequenti; questo può significare che queste combinazioni aplotipiche abbiano subito una selezione positiva. Sempre a livello di GH1/GH2-N, è stata evidenziata un'influenza dei frammenti II e VI sul contenuto in proteine, che tra l'altro mostrava lo stesso andamento rispetto al contenuto in caseina; ciò indica che l'effetto sulla componente proteica esercitato da alcuni genotipi era dovuto in realtà da un'influenza sul contenuto in caseina, che è la componente proteica quantitativamente più importante presente nel latte. La correlazione

fra il polimorfismo del gene GH2-N e la percentuale proteica non è stata trovata da Marques et al., (2006) nelle pecore di razza Serra da Estrela.

Se si prende in considerazione il gene GH2-Z, il profilo più produttivo in termini quantitativi (profilo A del frammento I) era anche associato a una percentuale di grasso superiore. Questo profilo corrispondeva alla combinazione aplotipica -259C/-169C. Queste posizioni nucleotidiche determinano la presenza di un potenziale sito di legame per il fattore di trascrizione C/EBPalp, a monte del nucleotide -82, che è la regione che differisce fra GH1/GH2-N e GH2-Z. Anche Marques et al. (2006) hanno segnalato l'influenza del gene GH2-Z sulla produzione di latte negli ovini di razza Serra da Estrela.

È stata inoltre evidenziata un'associazione del frammento VI con il tenore in grasso, proteine e caseine, indipendente dalla quantità di latte prodotta. Apparentemente, l'elemento che differiva tra i gruppi era la presenza della variazione c.556A>G nell'esone 5, corrispondente a p.Gly186Ser nella proteina matura. In particolare il pattern C del frammento IV presentava una A al nt c.556, e risultava associato a un più basso tenore in grasso, proteine e caseine.

Dunque questa mutazione potrebbe avere un significato funzionale, sebbene le analisi effettuate con l'utilizzo dei principali software non abbiano evidenziato sostanziali influenze sulla funzione della proteina,

ad eccezione solamente della possibile introduzione di un nuovo sito di fosforilazione.

Le associazioni fra i polimorfismi del gene GH ovino e le caratteristiche produttive del latte possono essere dovute a un effetto diretto del gene GH1/GH2-N espresso nell'ipofisi sul metabolismo della pecora in lattazione; oppure all'azione del gene GH2-Z, espresso nella placenta, che potrebbe esercitare un effetto indiretto sulla produzione del latte (Marques et al., 2006). Inoltre, bisogna tener presente il fatto che gli effetti evidenziati possono essere dovuti al *linkage* delle varianti nucleotidiche analizzate con altri eventuali polimorfismi nucleotidici che ancora non sono stati scoperti, che avrebbero un effetto diretto su questi caratteri.

6. Conclusioni

Conclusioni

Le copie geniche GH1/GH2-N e GH2-Z presentavano variazioni nucleotidiche polimorfiche nella popolazione analizzata, che erano tutte copia-specifiche, tranne c.255G>A, localizzata nel terzo esone e l'inserzione/delezione di una Timina 30 bp a valle dello stop codon, che potrebbe fornire interessanti informazioni sulla filogenesi dei ruminanti.

E' stata osservata, all'interno di ciascun gene, una variabilità delle regioni promotore che potrebbe avere delle conseguenze a livello regolatorio, sull'espressione dell'ormone della crescita, a causa del potenziale coinvolgimento in siti di legame per fattori di trascrizione.

Entrambe le copie geniche influenzavano la produzione e la composizione del latte, in quanto alcuni genotipi tendevano a produrre maggiori quantità di latte, con un più alto contenuto in grasso. Questi genotipi possono essere messi in relazione agli aplotipi più comuni nella popolazione ovina analizzata. Inoltre, alcuni genotipi mostravano una correlazione con il contenuto proteico del latte, e in particolare con il contenuto caseinico.

Questi risultati aumentano la conoscenza della variabilità di sequenza del gene GH ovino e della sua influenza sui caratteri del latte, e possono avere implicazioni nell'allevamento degli ovini da latte.

7. Bibliografia

Filippo Balia,
“Effetto del polimorfismo del gene GH ovino sulla produzione di latte”,
Tesi di dottorato in “Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli
Alimenti di Origine Animale”,
Università degli studi di Sassari

- Adzhubei IA Schmidt S Peshkin L Ramensky VE Gerasimova A Bork
P Kondrashov AS Sunyaev SR (2010) A method and server for
predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248-249
- Aguggini G Beghelli V Giulio L F (1998) *Fisiologia degli Animali
Domestici con elementi di Etologia*. Seconda edizione. UTET.
- Asso.Na.Pa. 2012. Associazione Nazionale della Pastorizia, Online:
<http://www.assonapa.it/>
- Avallone L Caola G Clement MG Ferlazzo A Naitana S Panzera M
Albertini M Fazio E Piccione G (2009) *Fisiologia Veterinaria*.
Point Veterinaire Italie.
- Bittante G Andrighetto I Ramanzin M (2005) *Tecniche di produzione
animale*. Ed. Liviana.
- Brunham LR Singaraja RR Pape TD Kejariwal A Thomas PD Hayden
MR (2005) Accurate Prediction of the Functional Significance of
Single Nucleotide Polymorphisms and Mutations in the ABCA1
Gene. *PLoS Genet* 1: e83. doi: 10.1371/journal.pgen.0010083
- Bunch TD Wu C Zhang Y-P Wang S (2006) Phylogenetic analysis of
snow sheep (*Ovis nivicola*) and closely related taxa. *Journal of
Heredity* 97, 21–30
- Carcangiu V Vacca GM (2005) La riproduzione nella pecora di razza
Sarda. *Riv Zoot Vet* vol. 33:27-34

- Carta A Casu S Salaris S (2009) Invited review: Current state of genetic improvement in dairy sheep. *J Dairy Sci* 92 :5814–5833
- Chemineau P Malpaux B Thiéry JC Vigùè C Morello H Zarazaga L Pelletier J (1995) The control of seasonality: a challenge to small ruminant breeding. In: Enne G Greppi GF Lauria A (Eds), *Reproduction and Animal Breeding. Advances and strategy*, Elsevier, Amsterdam, pp 225-250
- Chessa B Pereira F Arnaud F Amorim A Goyache F Mainland I Kao RR Pemberton JM Beraldi D Stear MJ Alberti A Pittau M Iannuzzi L Banabazi MH Kazwala RR Zhang Y Arranz JJ Ali BA Wang Z Uzun M Dione MM Olsaker I Holm LE Saarma U Ahmad S Marzanov N Eythorsdottir E Holland MJ Ajmone-Marsan P Bruford MW Kantanen J Spencer TE Palmarini M (2009) Revealing the History of Sheep Domestication Using Retrovirus Integrations VOL 324 *SCIENCE* 532-536
- Cowie AT Forsyth IA Hart IC (1980). *Hormonal Control of Lactation*. Berlin: Springer-Verlag.
- Cunningham JC (2006) *Manuale di fisiologia veterinaria*. Antonio Delfino Editore.

- Dybus A Grzesiak W Szatkowska I Błaszczyk P (2004) Association between the growth hormone combined genotypes and dairy traits in Polish Black-and-White cows. *Anim Sci Pap Rep* 22:185-194
- Etherton TD Bauman DE (1998) Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* 78:745-761
- FAOSTAT. 2010. Online <http://www.faostat.fao.org>. FAO, Rome, Italy.
- Fedosenko A Blank D 2005. *Ovis ammon*. *Mammalian Species* 773, 1–15.
- Fernandez N Rodriguez M Peris C Barcelo M Molina MP Torres A (1995) Bovine Somatotropin Dose Titration in Lactating Dairy Ewes. Milk Yield and Milk Composition *J Dairy Sci* 78:1073-1082
- Flint DJ Knight CH (1997) Interactions of Prolactin and Growth Hormone (GH) in the Regulation of Mammary Gland Function and Epithelial Cell Survival. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, Vol. 2, No. 1, 41-48.
- Gootwine E Ofir R Yossefi S (1996) Characterization of Pvull polymorphisms between the ovine growth hormone GH2-N and GH2-Z gene copies. *Anim Biotechnol* 7:135-1

- Groeneveld LF Lenstra JA Eding H Toro MA Scherf B Pilling D
Negrini R Finlay EK Jianlin H Groeneveld E Weigend S and The
GLOBALDIV Consortium (2010) Genetic diversity in farm
animals – a review. International Society for Animal Genetics,
Animal Genetics, 41 (Suppl. 1), 6–31
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment
editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic
Acids Symp Ser 41:95-98
- Hiendleder S Kaupe B Wassmuth R Janke A (2002) Molecular analysis
of wild and domestic sheep questions current nomenclature and
provides evidence for domestication from two different
subspecies. Proceedings of the Royal Society of London, Series
B: Biological Sciences 269, 893–904.
- IZS, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise
“G. Caporale” (2008) Banca Dati Nazionale Anagrafe Zootecnica.
[http://www.izs.it/IZS/Engine/RAServePG.php/P/256910010304/
L/1](http://www.izs.it/IZS/Engine/RAServePG.php/P/256910010304/L/1)
- Kurpios NA Sabolic NA Shepherd TG Fidalgo GM Hassell JA (2003)
Function of PEA3 Ets Transcription Factors in Mammary Gland
Development and Oncogenesis. J Mammary Gland Biol
Neoplasia 8:177-190

- Lacroix MC Devinoy E Servely JL Puissant C Kann G (1996)
Expression of the growth hormone gene in ovine placenta:
detection and cellular localization of the protein. *Endocrinology*
137:4886-4892
- Lagziel A Lipkin E Soller M (1996) Association between SSCP
haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein
percentage. *Genetics* 142:945-951 (Corrigendum 1997 *Genetics*
146 442)
- Leibovich H Gertler A Bazer F Gootwine E (2001) Effects of
recombinant ovine placental lactogen and recombinant ovine
growth hormone on growth of lambs and milk production of
ewes. *Livestock Production Science* 68:79–86
- Li B Wang X Zhou F Saunders NA Frazer ICH Zhao K-N (2008) Up-
regulated expression of Sp1 protein coincident with a viral protein
in human and mouse differentiating keratinocytes may act as a
cell differentiation marker. *Differentiation* 76:1068-1080
- Malveiro E Pereira M Marques PX Santos IC Belo C Renaville R
Cravador A (2001) Polymorphisms at the five exons of the
growth hormone gene in the algarvia goat: possible association
with milk traits. *Small Ruminant Res* 41:163-170

- Marques PX Pereira M Marques MR Santos IC Belo CC Renaville R Cravador A (2003) Association of milk traits with SSCP polymorphisms at the growth hormone gene in the Serrana goat. *Small Ruminant Res* 50:177-185
- Marques MR Santos IC Carolino N Belo CC Renaville R Cravador A (2006) Effects of genetic polymorphisms at the growth hormone gene on milk yield in Serra da Estrela sheep. *J Dairy Res* 73:394-405
- Mura MC Daga C Paludo M Luridiana S Pazzola M Bodano S Dettori ML Vacca GM Carcangiu V (2012) Analysis of polymorphism within POU1F1 gene in relation to milk production traits in dairy Sarda sheep breed. *Mol Biol Rep* 39(6):6975-9
- Nadler CF Hoffmann RS Woolf A (1973) G-band patterns as chromosomal markers, and the interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (*Ovis*). *Experientia* 29, 117–119.
- Obenauer JC Cantley LC Yaffe MB (2003) Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 31:3635-41
- Ofir R Gootwine E (1997) Ovine growth hormone gene duplication-structural and evolutionary implications. *Mammal Genome* 8:770-772

- Payne VA Au W-S Lowe CE Rahman SM Friedman JE O'rahilly S
Rochford JJ (2009) C/EBP transcription factors regulate
SREBP1c gene expression during adipogenesis. *Biochem Journal*
425:215-223
- R Development Core Team 2008 R: A language and environment for
statistical computing. R Foundation for Statistical Computing,
Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL [http://www.R-
project.org](http://www.R-project.org)
- Rada-Iglesias A Ameer A Kapranov P Enroth S Komorowski J
Gingeras TR Wadelius C (2008) Whole-genome maps of USF1
and USF2 binding and histone H3 acetylation reveal new aspects
of promoter structure and candidate genes for common human
disorders. *Genome Res* 18:380-392
- Rezaei HR Naderi S Chintauan-Marquier IC Taberlet P Virk AT
Naghash HR Rioux D Kaboli M Pompanon F (2010) Evolution
and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia,
Artiodactyla, Bovidae) *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54
315–326
- Sanna SR Casu S Ruda G Carta A Ligios S Molle G (2001)
Comparison between native and 'synthetic' sheep breeds for milk
production in Sardinia. *Livestock Production Science* 71 11–16

- Shimoni Y Friedlander G Hetzroni G Niv G Altuvia S Biham O
Margalit H (2007) Regulation of gene expression by small non-
coding RNAs: a quantitative view. *Mol Syst Biol* 3:138-146
- Stephens M Smith NJ Donnelly P (2001) A new statistical method for
haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*
68:978-989
- Vacca GM Carcangiu V Dettori ML Pazzola M Mura MC Luridiana S
Tilloca G (2008) Productive performance and meat quality of
Mouflon x Sarda and Sarda x Sarda suckling lambs. *Meat Sci*
80:326-334
- Valdez R Nadler CF Bunch TD (1978) Evolution of wild sheep in Iran.
Evolution 32, 56–72.
- Valinsky A Shani M Gootwine E (1990) Restriction fragment length
polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result
of variation in gene number. *Anim Biotechnol* 1:135-144
- Wallis M Lioupis A Wallis OC (1998) Duplicate growth hormone
genes in sheep and goat. *Journal of Molecular Endocrinology*,
21:1-5.
- Yamano Y Abe M Mikawa S Kioka N Manabe E Sakai H Komano T
Utsumi K Iritani A (1991) Structural analysis of repetitive DNA

sequences in the goat growth hormone gene region. *Agric Biol Chem* 55:633-639

Yeh F Yang RC Boyle T (2000) Popgene V.1.32. Microsoft Windows based Freeware for Population Genetic Analysis. <http://www.ualberta.ca/fyeh/index.htm>

Zeder MA (2008) Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proc Natl Acad Sci*, 105(33):11597–11604