

Università degli Studi della Tuscia di Viterbo

Dipartimento di Produzioni Animali

DOTTORATO DI RICERCA IN ECOLOGIA
E GESTIONE DELLE RISORSE BIOLOGICHE
XVIII CICLO

**Studio della variabilità genetica
di popolazioni di *Capra hircus* europee
e del Bacino del Mediterraneo
mediante marcatori molecolari AFLP**

AGR17

Tutor:

Prof. Alessio Valentini

Coordinatore:

Prof. Giuseppe Nascetti

Dottoranda:

Dott.ssa Jamila Bernardi

Indice

1. Introduzione	pag.1
1.1 Definizione di biodiversità	pag.1
1.2 Valore e misura della biodiversità	pag.3
1.3 Perdita di biodiversità	pag.6
1.4 Processi evolutivi che danno origine alla diversità genetica	pag.8
1.5 Diversità genetica delle specie allevate	pag.10
1.6 Conservazione della biodiversità nelle specie allevate	pag.12
<i><u>1.6.2 Strategie di conservazione</u></i>	<i><u>pag.15</u></i>
<i><u>1.6.2 Conservazione nelle aree marginali</u></i>	<i><u>pag.19</u></i>
1.7 Strumenti molecolari	pag.20
1.8 AFLP	pag.28
1.9 <i>Capra hircus</i>	pag.32
<i><u>1.9.1 Importanza e distribuzione geografica</u></i>	<i><u>pag.32</u></i>
<i><u>1.9.2 Domesticazione</u></i>	<i><u>pag.33</u></i>
<i><u>1.9.3 Variabilità genetica nelle capre: stato dell'arte</u></i>	<i><u>pag.35</u></i>
1.10 Progetto ECONOGENE	pag.39
 2. Materiali e Metodi	 pag.44

2.1 Le razze caprine europee	pag.44
<i><u>2.1.1 Razze caprine campionate</u></i>	<i><u>pag.45</u></i>
<i><u>2.1.2 Criteri usati per il campionamento</u></i>	<i><u>pag.49</u></i>
2.2 Estrazione del DNA	pag.50
2.3 Protocollo AFLP	pag.53
<i><u>2.3.1 Preparazione del templat</u></i>	<i><u>pag.54</u></i>
<i><u>2.3.2 Reazione AFLP: preamplificazione</u></i>	<i><u>pag.55</u></i>
<i><u>2.3.3 Marcatura del primer</u></i>	<i><u>pag.56</u></i>
<i><u>2.3.4 Reazione AFLP: amplificazione selettiva</u></i>	<i><u>pag.56</u></i>
<i><u>2.3.5 Corsa elettroforetica e rilevazione</u></i>	<i><u>pag.57</u></i>
2.4 Scelta delle combinazioni di primer AFLP	pag.59
2.5 Metodi di analisi statistica	pag.63
<i><u>2.5.1 Summary statistic</u></i>	<i><u>pag.63</u></i>
<i><u>2.5.2 Stima delle frequenze alleliche e numero di loci polimorfici</u></i>	<i><u>pag.64</u></i>
<i><u>2.5.3 Eterozigosit� attesa</u></i>	<i><u>pag.65</u></i>
<i><u>2.5.4 Similarit� di Jaccard</u></i>	<i><u>pag.65</u></i>
<i><u>2.5.5 Distanze genetiche</u></i>	<i><u>pag.66</u></i>
<i><u>2.5.6 G_{ST} e θ</u></i>	<i><u>pag.67</u></i>
<i><u>2.5.7 Dendrogrammi: metodo Neighbor Joining</u></i>	<i><u>pag.68</u></i>
<i><u>2.5.8 Analisi multivariata</u></i>	<i><u>pag.68</u></i>
2.6 Rappresentazione dei dati genetici su quelli geografici	pag.70
<i><u>2.6.1 Database dei Centroidi</u></i>	<i><u>pag.70</u></i>

<u>2.6.2 Interpolazione</u>	<u>pag.72</u>
3. Risultati e discussione	pag.73
3.1 Variabilità genetica e marcatori neutri	pag.73
3.2 Tecnica AFLP	pag.76
<u>3.2.1 Affidabilità</u>	<u>pag.77</u>
<u>3.2.2 Polimorfismo</u>	<u>pag.78</u>
3.3 Frequenze alleliche ed eterozigosi media attesa	pag.85
3.4 Similarità genetica (Jaccard)	pag.90
3.5 Analisi fattoriale delle corrispondenze (FCA)	pag.92
3.6 Analisi della composizione della variabilità genetica	pag.96
3.7 Distanze genetiche tra razze	pag.97
3.8 Analisi genetica multivariata	pag.99
3.9 Descrizione delle razze Orobica e Tauernschecken	pag. 99
3.10 Analisi integrata	pag.102
3.11 Variabilità e conservazione	pag.106
4. Conclusioni	pag.107
Bibliografia	pag.111

Appendice A

pag.130

Appendice B

pag.134

1. Introduzione

Il termine “biodiversità” è stato ampiamente utilizzato e discusso in occasione del congresso internazionale di Rio de Janeiro del 1992. Nel documento redatto dalla *Convention of Animal Diversity and Domestic Animal Diversity* la biodiversità è stata definita come la “variabilità tra e all’interno delle specie degli organismi viventi appartenenti ad ecosistemi terrestri, marini ed acquatici nei loro complessi ecologici”. La presa di coscienza dell’importanza della biodiversità e della sua conservazione ha dato il via a una serie di interventi e strategie atte alla valutazione della diversità biologica a tutti i livelli al fine di mantenere gli ecosistemi naturali e preservare le specie in via di estinzione.

1.1 Definizione di biodiversità

La biodiversità può essere definita come la variabilità totale esistente tra gli organismi viventi (l’insieme delle specie animali, vegetali e dei microrganismi). Wilson (1992) considera la biodiversità come la totalità della variabilità a tutti i livelli di organizzazione, dalla variabilità dei geni all’interno di una singola popolazione o di una specie, alla varietà delle specie che compongono tutta o una parte di una comunità, fino alle comunità stesse che costituiscono la porzione vivente dei diversi ecosistemi della terra.

Eldredge (2004) suddivide la diversità biologica in diversi livelli di organizzazione che la caratterizzano e la chiariscono. I livelli sono quello genetico, degli organismi, delle popolazioni, delle specie, delle comunità, degli ecosistemi e della biogeografia. La diversità genetica è costituita dalle diverse forme di un gene presenti in un individuo e dalla variabilità tra individui e tra le popolazioni. La diversità degli organismi è determinata dalla varietà delle caratteristiche anatomiche, fisiologiche, comportamentali di ogni singolo individuo. La diversità delle popolazioni riguarda invece la variabilità delle popolazioni sul piano quantitativo (considera la consistenza numerica degli individui) e su quello spaziale (ovvero la distribuzione geografica delle popolazioni stesse). La diversità specifica è rappresentata dalla numerosità e dalla diversificazione filogenetica delle specie presenti in una determinata area; la diversità delle comunità riguarda la variabilità delle interazioni ecologiche tra organismi, popolazioni, specie che condividono un ambiente, comprendendo la diversificazione delle comunità che in esso si formano. La diversità degli ecosistemi è la variabilità degli organismi in relazione all'habitat in cui vivono considerando l'interdipendenza tra le diverse comunità di esseri viventi. La diversità ecologica e tra contesti ecologici considera la diversità tra le specie appartenenti ad ambienti distinti (come terrestre e acquatico) e la diversità biogeografia la variabilità nella storia evolutiva correlata alla storia geologica e geografico-climatica della regione stessa o del contesto.

La diversità genetica degli organismi, delle popolazioni e delle specie riguarda gli organismi stessi, mentre la diversità tra le comunità e gli ecosistemi considera i rapporti che intercorrono tra gli organismi e ciò che li circonda. Schematizzando, i livelli in cui si può suddividere la "biodiversità" sono, in ordine gerarchico decrescente: l'ambiente, l'ecosistema, la comunità, la popolazione, l'individuo, il fenotipo e il gene.

1.2 Valore e misura della biodiversità

La biodiversità può essere considerata per il suo valore intrinseco, che è insito in ogni essere vivente proprio perché appartenente all'ecosistema naturale o per il suo valore estrinseco (o strumentale) ovvero l'utilizzo degli organismi viventi per fini utilitaristici nei confronti dell'uomo o di altri organismi interdipendenti. Questi valori comprendono l'aspetto ecologico, genetico, sociale, economico, scientifico, culturale ed estetico e sono spesso associati alla vita e alla attività umana (alimentazione, acqua, risorse forestali) (Eldredge, 2004).

La diversità biologica può essere misurata considerando la suddivisione in 3 componenti: ecosistema, popolazione e componente genetica e descrivendo ciascuno di essi tramite attributi: composizione, struttura e funzione (Redford & Richter, 1999). La composizione riguarda l'identità e la varietà degli elementi, la struttura considera la loro organizzazione fisica e distribuzione e la funzione riguarda i processi ecologici ed evolutivi che agiscono tra gli elementi stessi. Nella tabella 1.1 sono descritti, in funzione degli attributi, i 3 livelli di complessità biologica:

<i>Attributi</i>			
<i>Componenti della biodiversità</i>	<i>Composizione</i>	<i>Struttura</i>	<i>Funzione</i>
<i>Comunità/ecosistema</i>	Presenza, ricchezza, frequenza e relativa abbondanza di corporazioni e specie; proporzione di specie endemiche, esotiche, minacciate;	struttura trofica, abbondanza e distribuzione di connessioni e configurazioni delle specie	Estensione, frequenza, intensità e durata delle perturbazioni, flussi e pattern di energia e nutrienti, produzione di biomassa,
<i>Popolazione/specie</i>	Abbondanza, biomassa o densità, frequenza, importanza	Dispersione, zona di distribuzione, struttura della popolazione	Processi demografici (fertilità, capacità di sopravvivenza, dispersione, mortalità
<i>Genetica</i>	Diversità allelica, presenza di alleli rari, recessivi deleteri o varianti cariotipiche	<i>Effective population size</i> , eterozigosità, polimorfismo a livello di genotipo e fenotipo	depressione da inbreeding, panmissia, tasso di deriva genetica, flusso genico, migrazione, intensità di selezione

Tabella 1.1: componenti e attributi della biodiversità (Redford & Richter, 1999)

Le fluttuazioni della biodiversità a livello di specie può avere conseguenze dirette per i componenti dell'ecosistema (costituito dalla somma di tutte le specie, dalle loro interazioni e dall'ambiente che le circonda) e come risultato intaccare le attività economiche e sociali dell'uomo. Sono definiti i "servizi dell'ecosistema" i processi che coinvolgono l'attività e la vita umana negli ecosistemi naturali (Chapin et al, 2000) come il mantenimento della fertilità del suolo, la regolazione del clima e il rifornimento di beni alimentari e non (come il legname).

La diversità di un ecosistema non dipende soltanto dalle entità biologiche e fisiche che esso contiene, ma anche dalle interazioni ecologiche tra queste entità. La diversità degli ecosistemi è strettamente legata al tipo di risorse

naturali disponibili in un particolare habitat e al modo in cui esse sono utilizzate dagli organismi che lo occupano (Eldredge, 2004). Le informazioni rese disponibili dai rilevamenti satellitari sull'area in cui una determinata specie vive o su quali sono i suoi spostamenti possono essere utili per capire più a fondo le interazioni tra le popolazioni e il loro ambiente. Uno strumento che elabora le informazioni geografiche costruendo database e modelli rappresentati su mappe è il GIS (sistema di informazione geografica). In queste mappe geografiche possono essere visualizzate le tipologie di vegetazione, la fauna, l'utilizzo dei suoli (per esempio se sono coltivati) e le variazioni climatiche.

Per stimare la biodiversità dal punto di vista ecologico si considera comunemente il numero delle specie presenti in una determinata area (la ricchezza in specie). Altre misure sono quelle che riguardano la diversità dei gruppi tassonomici (considerano la diversità dal punto di vista delle correlazioni filogenetiche) e l'uniformità, ovvero la distribuzione con cui le specie sono rappresentate. Per esempio in base alla numerosità relativa di una specie rispetto alle altre appartenenti a uno stesso ecosistema si distinguono specie rare, comuni o intermedie (Purvis & Hector, 2000). L'incompletezza delle classificazioni tassonomiche (si stima che l'80% delle specie non sia ancora stato determinato e classificato) è la maggior causa di errore nella stima della biodiversità basata sulla identificazione e il conteggio numerico delle specie.

Risulta inoltre difficile distinguere le specie come entità (soprattutto nel caso di popolazioni molto vicine sia dal punto di vista ecologico che genetico); per questo sono state introdotte altre unità di conservazione che possono essere descritte in maniera univoca:

- evolutionarily significant unit (ESU) (Ryder, 1986)
- *management unit* (MU)
- semispecie (una specie emergente nelle prime fasi di speciazione)
- specie incipienti (nuova coppia di specie)
- subspecie

Le *evolutionarily significant unit* (ESU) definite da Moritz (1994) come le unità minime di gestione di conservazione, furono introdotte appunto per evitare i problemi associati alla esatta definizione di specie. Una ESU è definita come un insieme di popolazioni morfologicamente, geneticamente ed evolutivamente distinte da altre popolazioni simili. Le popolazioni che appartenengono alla stessa ESU sono monofiletiche: la condizione di monofilia reciproca avviene quando una popolazione si isola demograficamente dalle altre fino a non condividere più la maggior parte degli alleli (Bruford, 2004). Si può definire un secondo livello di conservazione oltre le ESU, che può essere utilizzato nello studio delle razze zootecniche, quello delle *management unit* (MU). Le MU considerano come unità di conservazione le popolazioni che possiedono alleli distintivi dal punto di vista delle frequenze alleliche.

1.3 Perdita di biodiversità

La diversità biologica, emersa grazie a un lungo processo evolutivo che si attua da oltre tre miliardi e mezzo di anni, sta declinando con notevole rapidità soprattutto a causa dell'attività umana (Chapin, 2000). Attraverso lo sfruttamento delle risorse ambientali e la frammentazione degli habitat, l'uomo sta alterando tutti gli ecosistemi, sia terrestri che acquatici. Non tutti gli

ambienti naturali risentono allo stesso modo della pressione antropica in quanto la variabilità biologica dipende soprattutto da fattori geografici (diminuisce dall'equatore ai poli e con l'aumento dell'altitudine), e climatici (irraggiamento solare e precipitazioni). Il fenomeno risulta preoccupante soprattutto negli ambienti ricchi di biodiversità (come le foreste tropicali, i laghi e le barriere coralline).

I fattori che causano la perdita di biodiversità in modo diretto sono la frammentazione degli habitat, l'introduzione di specie invasive, l'inquinamento, l'eccessivo sfruttamento delle risorse e il cambiamento di clima su scala globale (Eldredge, 2004). Le cause indirette che minacciano la biodiversità sono la sovrappopolazione e i consumi eccessivi; esse sono strettamente associate ai fattori sociali, economici e politici dei singoli stati. Tra le cause globali che modificano gli ecosistemi e le comunità è da considerarsi il cambiamento del clima: il riscaldamento della temperatura terrestre determina variazioni non solo a livello delle distribuzioni geografiche di animali e piante, ma anche alterazione negli habitat (soprattutto per specie che vivono a elevate altitudini o poco al di sotto di una temperatura limite per la sopravvivenza). La sinergia e il coinvolgimento di una parte o di tutti questi fattori può provocare l'estinzione delle specie attuali e intaccare l'evoluzione delle specie incipienti. Gli effetti della perdita di biodiversità infatti riguardano principalmente il lungo termine e sono maggiori se le specie perse hanno interazioni con gli altri membri dell'ecosistema (Hector, 2001).

1.4 Processi evolutivi che danno origine alla diversità genetica

Nelle popolazioni naturali la variabilità genetica è modificata da fenomeni quali il flusso genico (o migrazione), la selezione naturale, l'inbreeding e la deriva genetica. I fenomeni della deriva genetica e dell'inincrocio (incrocio tra individui imparentati) determinano una riduzione della diversità e un aumento nel numero di omozigoti. La deriva genetica è un processo stocastico che causa una fluttuazione casuale delle frequenze alleliche e può provocare, nelle generazioni, la fissazione di alcuni alleli e la perdita di altri. L'effetto della deriva può essere accentuato da eventi occasionali come l'"effetto collo di bottiglia" e l'"effetto fondatore", che causano una diminuzione drastica della dimensione effettiva della popolazione (N_e , che rappresenta la dimensione "ideale" della popolazione secondo il modello di Wright-Fisher). L'inincrocio, diffuso soprattutto nelle specie allevate, avviene quando gli accoppiamenti tra parenti sono maggiori rispetto a quelli tra non parenti; esso comporta una diminuzione della variabilità e un deficit di eterozigoti. *Inbreeding* e deriva agiscono sulle frequenze alleliche a livello di specie e popolazioni, mentre il flusso genico agisce solo sulle popolazioni e le sottopopolazioni modificandone la struttura. La migrazione contribuisce, attraverso lo scambio di materiale genetico tra le popolazioni, all'aumento delle loro dimensioni effettive e alla riduzione della divergenza tra le stesse (che diventano più omogenee). A livello di specie l'effetto del flusso genico contrasta quello causato da deriva e inincrocio, che risulta in una fonte di variabilità genetica e determina un incremento della diversità delle popolazioni coinvolte.

I processi che provocano un incremento della diversità nelle popolazioni naturali sono la mutazione e, negli individui a riproduzione sessuata, la

ricombinazione. La mutazione è l'unico processo in grado di generare nuovi alleli ed è un evento casuale. Secondo Kimura (modello neutrale dell'evoluzione, 1987) le variazioni delle sostituzioni nucleotidiche (generate da errori di riparazione durante la replicazione del DNA) sono principalmente neutrali e sono "manipolate" dalla deriva genetica. Nell'uomo è stato stimato che circa 4 nuove mutazioni che portano alla alterazione della sequenza aminoacidica nascono per genoma diploide per generazione, e il tasso di mutazione (considerato come sostituzione o inserzione-delezione) per sito e per generazione è stimato come 2.5×10^{-8} (18).

Le mutazioni rappresentano il "materiale grezzo" su cui i processi selettivi agiscono; la selezione può determinare la presenza di mutazioni vantaggiose (adattative), deleterie o neutrali. Il processo di selezione infatti agisce, al contrario di mutazione, migrazione e deriva (che modificano le frequenze alleliche indipendentemente dal fatto che queste variazioni influiscano positivamente o negativamente sulla capacità riproduttiva) aumentando la fitness, ovvero l'efficienza riproduttiva di un dato genotipo in un dato ambiente e in un dato momento (Fisher, 1930). La selezione naturale (Edwards, 2002) può essere definita come l'insieme dei fattori che tendono a favorire, o sfavorire, la tendenza a riprodursi di un dato genotipo. L'adattamento è sostanzialmente l'effetto della selezione naturale; in termini evolutivi esso indica una variazione delle caratteristiche di un organismo in relazione all'ambiente. L'evoluzione adattativa (chiamata anche selezione positiva) è il processo con il quale un allele, che è vantaggioso sia per la riproduzione che per la sopravvivenza, aumenta in frequenza come risultato di un incremento della fitness dell'individuo che porta l'allele stesso (Morin *et al.*, 2004).

Gli effetti della deriva genetica e dell'inbreeding sono inversamente proporzionali alla dimensione effettiva della popolazione (N_e , che considera il numero degli individui in grado di riprodursi): popolazioni con alto N_e tenderanno a perdere la variabilità genetica più lentamente rispetto a quelle con più basso N_e . La minore variabilità genetica non è di per sé fonte di allarme, perché alcune specie hanno storicamente una diversità moderata; è importante invece monitorare i repentini cambiamenti di variabilità a cui sono soggette talune popolazioni.

1.5 Diversità genetica delle specie allevate

Le razze allevate sono riconosciute come risorsa genetica dal *World conservation strategy* e dalla *FAO (Food and Agriculture Organization)*. Mason produsse nel 1988 un elenco delle razze allevate raccolte dalla bibliografia e per ognuna di esse specificò l'origine (paese o regione) e le caratteristiche principali. Le informazioni raccolte furono organizzate poi dalla *FAO* che costruì nel 1992 una banca dati globale denominata DAD-IS (*Global Databank for Farm Animal Genetic Resources*, <http://www.fao.org/dad-is/>).

L'analisi di questi dati ha evidenziato (Hall & Ruane, 1993) la presenza del 15% di razze rare, l'81% delle quali è localizzato in Europa. La ricchezza delle razze è maggiore nei paesi più popolati (esiste infatti una correlazione positiva tra popolazione umana e numero di razze) e nelle aree marginali (particolarmente dell'Europa).

La perdita della variabilità genetica nelle specie allevate è dovuta principalmente ai fenomeni di *inbreeding* e di deriva, che agiscono maggiormente nelle popolazioni dove la dimensione effettiva (N_e) è bassa (tipicamente nelle specie zootecniche, in cui esiste un disequilibrio tra numero di maschi e di femmine). Le specie allevate, oltre ad essere soggette ai fenomeni naturali che modificano le frequenze alleliche (principalmente deriva genetica), sono sottoposte ai processi di selezione artificiale (Bruford, 2004). L'uomo, soprattutto attraverso il controllo della riproduzione ha modificato i pool genici in modo da ottenere popolazioni uniche e spesso omogenee dal punto di vista fenotipico e con alta capacità produttiva: le razze. La razza infatti può essere definita come un insieme di animali selezionati per avere un aspetto uniforme che sia ereditabile e distinguibile dagli altri membri della stessa specie. (Hall & Bradley, 1995). Anche se le razze possono essere identificabili da un solo carattere fenotipico (tipicamente il colore del mantello) le differenze tra di esse riguardano l'intero genoma. Hammond (1994) ha stimato che circa il 50% della variabilità è all'interno delle razze e il 50% tra razze, mentre i risultati di analisi molecolari hanno deviato molto da questa stima, descrivendo una variabilità entro razza molto maggiore di quella tra razze (rispettivamente nell'ordine del 70-90% contro 30-10%); questa evidenza sottolinea come i geni sotto pressione selettiva siano molto limitati e che anche in presenza di selezione artificiale viene comunque mantenuto un elevato grado di variabilità ai loci non selezionati.

A livello globale l'incrocio indiscriminato è la causa principale di perdita di biodiversità nelle razze zootecniche. Inoltre la specializzazione dei nuovi sistemi produttivi e lo sfruttamento di poche razze (le cosiddette cosmopolite) con alte capacità produttive ha determinato una ulteriore e grave perdita di biodiversità all'interno delle specie domestiche. Si sta assistendo a una

contrazione numerica delle popolazioni dovuta all'uso intensivo di pochi animali migliorati nelle zone industriali e all'abbandono delle razze native, che diminuiscono di numero. Questo sfruttamento rischia di determinare la diminuzione della variabilità genetica e dell'eterozigosi nelle razze cosmopolite e di aumentare il pericolo di estinzione delle razze locali meno competitive (Simianer, 2005). Il mantenimento della variabilità all'interno delle razze riguarda misure che ampliano o mantengono la dimensione effettiva della popolazione (agendo sull'incremento del rapporto maschi/femmine o evitando accoppiamenti tra animali imparentati) (Gandini *et al.*, 2004). L'aumento della dimensione effettiva della popolazione riduce sia gli effetti della deriva, che la velocità di inbreeding, risultando in una diminuzione della depressione da inincrocio e abbassando il rischio di estinzione dovuto alle carenze riproduttive e di fitness.

Nel mondo sono state enumerate 3213 razze di asini, cavalli, capre, suini, pecore e bufali di cui circa 1000 sono a rischio di estinzione. In base alle stime pubblicate nella terza edizione del *World Watch List for Domestic Animal Diversity* ogni settimana, nel mondo, si estinguono due razze domestiche.

1.6 Conservazione della biodiversità nelle specie allevate

Le risorse viventi sfruttate dall'uomo sono alla base di studi ambientali che riguardano la complessità della natura e della società e una moltitudine di ambiti: biologia, genetica, ecologia, economia sociologia e politica. Un approccio multidisciplinare per risolvere i complessi problemi dell'ambiente è stato applicato per lo studio della conservazione delle risorse genetiche animali

(*animal genetic resources* , AnGR) (Bertaglia & Roosen, 2002). Le AnGR sono stimate globalmente come il 30% delle richieste di cibo dell'umanità (FAO 1999), senza contare l'importanza nei prodotti derivati non destinati all'alimentazione (pellame, lana). La decisione di intervenire riguardo la tutela delle risorse genetiche animali venne presa soprattutto per fronteggiare la minaccia costituita dall'agricoltura intensiva e le sue possibili conseguenze sulle popolazioni allevate. La strategia creata per gestire le AnGR consiste nell'identificazione e monitoraggio della biodiversità nei diversi paesi, e nella condivisione dei dati e loro integrazione per un uso sostenibile delle risorse biologiche con lo scopo di identificare e comprendere le risorse genetiche degli animali allevati e le priorità di conservazione

La FAO sta sviluppando da anni un programma integrato per la gestione globale delle risorse genetiche. Nell'Unione Europea allargata a 25 stati, secondo il database FAOstat (<http://faostat.fao.org/>) aggiornato al 2004, sono presenti 103 mila esemplari di pecore e 12 mila di capre. Le associazioni che si occupano della classificazione delle razze in Europa sono, oltre l'Unione Europea, l'EAAP-AGDB (*european association of animal production-animal genetic data bank*). Quest'ultima raggruppa in un sito (<http://www.tiho-hannover.de/einricht/zucht/eaap/factors.htm>) tutte le informazioni riguardanti le specie allevate europee e il loro grado di rischio di estinzione considerando 3 fattori.

1) Fattore principale: *effective population size* (N_e)

N_e è utilizzato come un indicatore di incremento della percentuale di inbreeding ΔF per generazione (decremento dell'eterozigosità) e della perdita di geni a causa dell'effetto della deriva genetica sulle frequenze alleliche.

Sono state organizzate 5 classi di rischio definite in accordo all'incremento totale di inbreeding $\Delta F-50$ durante 50 anni di riproduzione (intervallo di generazione standard), basato sul valore N_e :

Classi di rischio di estinzione	$\Delta F - 50$
Nessun rischio	< 5
Potenziale rischio	5 – 15
Rischio minimo	16 – 25
Rischio	26 – 40
Rischio critico	> 40

Dove:

$$N_e = 4 * M * F / (M + F) \text{ e } \Delta F \text{ per generazione} = 1 / (2 * N_e)$$

dove M e F sono rispettivamente il numero di maschi e femmine che si riproducono. Negli animali zootecnici i bassi valori di N_e sono essenzialmente causati dal numero scarso di riproduttori utilizzati.

2) Fattori aggiuntivi di rischio:

- Se più del 20% degli accoppiamenti è dovuto a incroci tra razze si ha l'aumento di una classe di rischio;
- L'aumento di una classe di rischio si ha in funzione del decremento del numero delle femmine in grado di riprodursi; in particolare il passaggio da una classe a un'altra superiore si ha se il numero delle femmine è minore di 1000;
- Il numero di mandrie allevate: l'incremento di una classe di rischio avviene quando il numero delle mandrie è minore di 10 e se quello delle femmine è minore di 500.

3) Scelta delle razze: lo stato di minaccia è considerato solamente per le razze locali.

1.6.1 Strategie di conservazione

La complessità nel scegliere le priorità di conservazione e nel definire strategie razionali crea molti quesiti: è meglio proteggere quelle popolazioni che hanno un'alta capacità di adattamento (e capacità di sopravvivenza nel lungo termine) o devono essere bersaglio quelle popolazioni che possiedono una spiccata unicità genetica (Bruford, 2004)? Secondo il paradosso *crowned crane* per esempio la soluzione ottimale in un'ottica di conservazione è quella di sacrificare una specie (o razza) altamente minacciata per fare sì che un'altra presente nello stesso habitat (ma meno minacciata) sia ancora più protetta (Weitzman, 1993) con lo scopo di massimizzare la diversità attesa nel futuro.

Per effettuare un'opportuna strategia di conservazione è necessario considerare tutti gli aspetti riguardanti la biodiversità e stabilire i criteri su cui basarsi per determinare le priorità di conservazione. Gli aspetti che sono maggiormente considerati in un'ottica di conservazione sono il pericolo di estinzione, l'adattamento, le caratteristiche uniche (a livello fenotipico e genetico) e il valore storico e culturale (Oldenbroek, 1999).

1) Grado di rischio (pericolo di estinzione)

Dipende principalmente dall'ampiezza della popolazione, ma anche dalla velocità con cui la numerosità cambia, il grado di rischio di incrocio con altre razze, l'organizzazione e la distribuzione degli animali. Il grado di minaccia (DE, *degree of endangerment*) (Gandini *et al.*, 2004) è considerato come la probabilità di estinzione di una razza in un determinato periodo di tempo. Il valore del DE di una razza stabilisce se questa deve essere

sottoposta ad azioni di conservazione prima delle altre, l'urgenza con cui queste strategie devono essere sviluppate e in quanto tempo è possibile intraprendere azioni di conservazione prima che la razza sia estinta;

2) Adattamento ad un ambiente specifico

Razze perfettamente adattate ad habitat specifici sono prioritarie, specialmente se l'ambiente in cui vivono è di interesse (commerciale o ecologico);

3) Caratteristiche uniche e importanti economicamente

L'unicità di una razza è un fattore decisivo per la sua conservazione: le caratteristiche genetiche uniche e non condivise con altri individui hanno un valore sia nell'immediato, sia come fonte di variabilità da cui attingere per il futuro. Sono importanti in questa ottica le razze portatrici di caratteristiche peculiari, come quelle comportamentali (carattere mansueto), fisiologiche, fenotipiche (robustezza) ed economiche (alta fertilità, l'adattabilità alle diverse tipologie di alimento, l'elevata qualità dei prodotti e la resistenza alle malattie);

4) Valore storico e culturale

Dipende dal tempo in cui la razza è presente in una determinata regione, dall'importanza storica dei suoi prodotti, dalla sua importanza come risorsa dal punto di vista estetico o etico-religioso;

5) Variabilità genetica

La variabilità genetica a livello di popolazioni o razze assicura una buona capacità di adattamento alle condizioni avverse (come cambiamenti

climatici e nuove malattie) e ai cambiamenti delle richieste di mercato (per esempio diversa composizione in grassi nelle carni) e delle condizioni di produzione.

Si sono sviluppati nell'ultimo decennio nuovi metodi per la determinazione delle migliori strategie di conservazione, a partire da quello di Weitzman (1992) che introdusse un approccio basato sul concetto di diversità attesa (o *diversity function D*). Questo metodo si pone come obiettivo quello di massimizzare la diversità: costruisce alberi di distanze genetiche (basati sulla *maximum-likelihood*), in cui la lunghezza di ogni ramo che rappresenta una razza è proporzionale al contributo di quella razza alla diversità totale. L'approccio di Weitzman è la proiezione della diversità nel futuro e riflette la probabilità che le razze si estinguano in un periodo di tempo stabilito: il contributo di un elemento (una specie o una razza) alla diversità del gruppo è proporzionale alla riduzione che sarebbe causata dalla rimozione dell'elemento dal gruppo. Nella misura della diversità secondo Weitzman non viene però considerata la diversità all'interno di ogni elemento (intraspecifica o entro-razza) e solo gli elementi che hanno una alta distanza genetica hanno una alta priorità di conservazione. Caballero & Toro (2002) sottolineano come le priorità di conservazione basate sulla diversità di Weitzman favoriscano solamente le razze filogeneticamente diverse senza considerare la variabilità entro razza, la grandezza della popolazione e l'inbreeding. Eding *et al.* (2002) propone un approccio in cui la diversità genetica è valutata sulla base di coefficienti medi di parentela calcolati sia tra che all'interno delle razze e tiene conto del "contributo genetico" (considerando l'alto numero di alleli e la bassa parentela) per costruire un'insieme selezionato di razze da conservare. Simianer (2005) propone una nuova strategia di conservazione che implica la considerazione sia delle razze con alta diversità genetica (in base alla funzione D di Weitzman),

che di quelle “migliori” secondo criteri non genetici (come la resistenza alle malattie e il valore specifico della razza).

Una volta stabilite le priorità di conservazione delle razze minacciate è necessario decidere come attuare le strategie di gestione. Si distinguono due principali tipi di conservazione: quella *ex-situ* e quella *in-situ*.

La conservazione *ex-situ* consiste nell'allevamento delle razze lontano dal loro contesto socio-economico ed ecologico (zoo o parchi) e viene attuata quando le popolazioni sono difficili da gestire e la loro conservazione nel luogo in cui vivono è svantaggiosa dal punto di vista economico. La conservazione *ex-situ* può essere condotta anche e soprattutto attraverso l'istituzione di banche del seme, banche dati di tessuti, di cellule somatiche e di DNA (la cosiddetta crio-conservazione).

Quando una razza è a forte rischio di estinzione e sono a disposizione risorse economiche sufficienti la conservazione *in-situ* è da preferire in quanto dà l'opportunità di monitorare la razza nel tempo e permette la loro valorizzazione dal punto di vista ecologico, culturale e socio-economico. Si parla in questo caso di conservazione dinamica: essa consente la continua evoluzione delle risorse in relazione ai cambiamenti dell'ambiente in cui le popolazioni vivono. La conservazione *in-situ* degli animali domestici viene spesso affiancata, soprattutto nei paesi europei, da quella *ex-situ* (per esempio con la crioconservazione del seme) (Hall & Bradley, 1995). Esistono due schemi (Oldenbroek, 1999) di conservazione *ex-situ* integrata da quella *in-situ*:

➤ schema *cryo-back-up*: il material crio-conservato è utilizzato come risorsa genetica nel caso in cui insorgano rischi improvvisi di estinzione;

➤ schema *cryo-aided*: gli intervalli di generazione vengono prolungati grazie alla crioconservazione.

Quando non ci sono risorse economiche che permettono di raggiungere il numero minimo di animali per generazione si utilizza l'approccio *cryo-aided*, altrimenti il *cryo-back-up* che costituisce un'assicurazione contro la perdita delle razze più minacciate.

1.6.2 Conservazione nelle aree marginali

Le aree marginali rappresentano la culla di razze ben adattate, ma continuamente minacciate sia dalla diffusa sostituzione con razze cosmopolite sia a causa dell'abbandono delle attività agricole e di allevamento. Le razze locali sono fonte preziosa di biodiversità e vanno preservate in quanto portatrici di caratteristiche di resistenza alle malattie, rusticità, più alta fertilità, attitudini materne e longevità.

Le attività di conservazione possono essere attuate in diverse forme (Simianer, 2005):

- Assegnamento di premi e incentivi ai proprietari di razze locali meno produttive;
- Offerta di corsi di formazione professionale per migliorare la gestione genetica all'interno della razza con lo scopo di ridurre l'inbreeding e la deriva genetica;
- Strategie di mercato che sviluppino prodotti locali e tipici, aumentando il valore aggiunto e quindi aumentando le rendite degli allevatori;
- Implementazione della crioconservazione degli embrioni e del seme;

➤ Scambio di animali maschi tra gli allevatori come schema di incrocio.

Le operazioni attuate e attuabili per il mantenimento delle razze caprine marginali per esempio consistono nell'incrementare la loro produttività, promuovere il commercio e la distribuzione dei loro prodotti (il latte e i derivati caseari) e migliorare le condizioni di vita degli allevatori di questi piccoli ruminanti in modo da ridurre l'esodo agricolo (Haenlein, 2001). Il futuro della conservazione della biodiversità degli animali domestici è legato alle decisioni delle agenzie internazionali per lo sviluppo che devono però avere la collaborazione e il sostegno delle politiche dei singoli stati.

Le nuove tecnologie permettono oggi di produrre con facilità strumenti molecolari da utilizzare per lo studio della variabilità genetica delle popolazioni e attuare quindi una conservazione e gestione sostenibile al fine di mantenere la biodiversità. Gli strumenti molecolari maggiormente utilizzati per lo studio della biodiversità sono i microsatelliti, i marcatori sul DNA mitocondriale, e gli AFLP (Schlotterer, 2004).

1.7 Strumenti molecolari

La biodiversità genetica è determinata da ogni variazione nei nucleotidi, nei geni, nei cromosomi o nell'intero genoma degli organismi.

Lo studio della variabilità genetica è facilitato dall'utilizzo di marcatori, che rappresentano caratteristiche ereditabili e polimorfiche a livello di specie, di

popolazioni e di individui. Un marcatore molecolare é un qualsiasi locus cromosomico le cui varianti alleliche possono essere identificate facilmente analizzando direttamente il DNA.

Un buon marcatore molecolare deve essere polimorfico, codominante, facilmente individuabile, ripetibile e possedere un meccanismo di trasmissione semplice (mendeliano o uniparentale).

I marcatori morfologici, che considerano le caratteristiche fenotipiche, sono influenzati enormemente dall'ambiente, mentre quelli biochimici (allozimi, gruppi sanguigni) e genetici (individuano i polimorfismi direttamente a livello del DNA) sono in genere marcatori neutri.

Gli **allozimi** (Harris, 1966) sono le varianti alleliche degli enzimi codificati da geni strutturali che differiscono in base al numero di sostituzioni aminoacidiche. La mutazione di un aminoacido porta alla variazione della carica della proteina e tale differenza può essere visualizzata tramite corsa su gel elettroforetico e conseguente colorazione. Gli allozimi sono il primo esempio di marcatore molecolare e sono stati ampiamente utilizzati in studi di genetica di popolazione e di biodiversità (Nevo, 2001, Krieger & Ross, 2002). Essendo marcatori poco abbondanti e poco polimorfici, sono stati sostituiti quasi completamente da marcatori basati sul DNA, che hanno come caratteristiche quelle di elevata variabilità (alto numero di loci polimorfici o di alleli per locus) e facile identificazione. L'elevato polimorfismo che contraddistingue i marcatori genetici ha inoltre permesso di effettuare studi di mappatura e di associazione (Schlotterer, 2004, Hillis *et al.*, 1996).

Le variazioni della sequenza genomica, che possono essere dovute a cambiamenti di singole basi, numero di ripetizioni di corte sequenze di-

nucleotidiche, inserzioni, delezioni o duplicazioni, sono identificate come diversi alleli o polimorfismi.

Le tecniche di biologia molecolare attualmente più utilizzate per l'individuazione dei differenti alleli riconosciuti dai marcatori si basano sull'utilizzo, separato o combinato, di endonucleasi di restrizione e della tecnica PCR (Mullis & Faloona, 1987). Una delle prime classi di marcatori molecolari ad essere utilizzata nell'analisi del genoma é stata quella dei marcatori **RFLP** (Botstein *et al.*, 1980). I polimorfismi sono identificati mediante restrizione del DNA con endonucleasi che agiscono riconoscendo e tagliando una specifica sequenza nucleotidica e producendo una serie di frammenti diversi tra loro in lunghezza. Mutazioni puntiformi, (che alterano la sequenza del DNA) o fenomeni di inserzione/delezione creano o distruggono il sito riconosciuto dall'enzima, dando origine ad un diverso profilo di restrizione del genoma e ad alleli di lunghezza differente. La tecnica RFLP consente di distinguere i diversi alleli del marcatore molecolare, di seguirne la segregazione in una popolazione scelta e di distinguere gli individui omozigoti dagli individui eterozigoti, per questo motivo sono detti "co-dominanti".

I principali marcatori che si basano sulla tecnologia PCR sono i microsatelliti (Weber & May, 1989), i RAPD (*Random Amplification Polymorphic DNA*, Williams *et al.*, 1990), gli AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, Vos *et al.*, 1995) e gli SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, Landegren *et al.*, 1998).

I marcatori **RAPD** sono identificati tramite PCR utilizzando primers a sequenza casuale della lunghezza di circa 10-12bp. La miscela di frammenti ottenuta dopo amplificazione é sottoposta ad elettroforesi su gel d'agarosio e usualmente visualizzata in presenza dell'agente intercalante bromuro d'etidio.

Il numero dei prodotti di amplificazione generati dalla PCR con primer arbitrari dipende dalla presenza di siti di legame tra DNA genomico e primer e/o la loro relativa affinità, mentre l'assenza di un particolare frammento può derivare da delezioni, inserzioni o mutazioni di basi nel DNA stampo a livello dei siti di legame del primer o nel segmento da essi delimitato. Tuttavia a causa dell'utilizzo di primer a sequenza casuale, la reazione di amplificazione PCR è condotta a bassa stringenza, causando problemi di ripetibilità (Saunders *et al.*, 2001). Lo studio di Schierwater & Ender (1993) ha evidenziato come diverse DNA polimerasi producono diversi marcatori RAPD e quindi come questa tecnologia non sia affidabile per studi di diversità.

La tecnica per produrre marcatori **AFLP** deriva dagli RFLP in quanto prevede una fase di restrizione enzimatica del DNA, ma è più complessa e selettiva in quanto prosegue con una ligazione di adattatori alle estremità dei frammenti prodotti e due successive reazioni PCR con primer specifici (complementari agli adattatori e con nucleotidi selettivi a una estremità). Questa tecnologia genera una miscela di frammenti che vengono separati ed identificati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide. I polimorfismi osservati derivano principalmente da mutazioni puntiformi nei siti riconosciuti dagli enzimi o dalle basi selettive dei primer (polimorfismo di sequenza), raramente da inserzioni/delezioni di sequenze (polimorfismo di lunghezza). Il vantaggio di questo metodo è che permette di analizzare numerosi loci in un unico esperimento e non richiede informazioni sulla sequenza del genoma che viene sottoposto ad analisi. I marcatori AFLP possono essere utili per lo studio di specie e popolazioni di cui non si hanno informazioni a livello genomico e hanno potere discriminante per quanto riguarda le razze e gli individui. Al contrario di altre tipologie di marcatori (come i microsatelliti), i RAPD e gli AFLP sono considerati marcatori "dominanti" e bi-allelici.

La classe di marcatori più utilizzata ad oggi per studi di biodiversità (Garza & Williamson, 2001) è quella dei **microsatelliti** (Tautz, 1989) o SSRs (*Simple Sequence Repeats*) o STR (*Short Tandem Repeats*) o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), ossia corte sequenze di di- o tri- nucleotidi ripetute in tandem e disperse nel genoma, solitamente in regioni non codificanti. La presenza nel genoma di queste corte sequenze ripetute genera la possibilità di eventi di crossing-over ineguale e di “slittamento” dell’elica del DNA durante la fase di replicazione (Ofir *et al.*, 1999). Questo porta ad una variazione (aumento o diminuzione) del numero di ripetizioni di sequenze contigue, con formazione di alleli che differiscono tra loro in lunghezza. L’identificazione di queste forme alleliche si basa sull’utilizzo della PCR: è possibile infatti disegnare primer complementari alle sequenze delle regioni fiancheggianti i microsatelliti, che sono in genere conservate. I frammenti amplificati possono variare in lunghezza e ciò dipende dal numero di ripetizioni della sequenza-base del microsatellite; ogni variazione rappresenta un allele. I marcatori STR sono estremamente variabili, multiallelici, co-dominanti e utili per lo studio della variabilità tra individui (il numero di ripetizioni di ogni marcatore varia in genere da individuo ad individuo). Da molti anni l’importanza dell’utilizzo dei microsatelliti nello studio delle specie allevate è riconosciuta (MacHugh *et al.*, 1997); essi sono utilizzati per la mappatura (Ihara *et al.*, 2004), la genetica di popolazione (Grant *et al.*, 2001), le analisi di parentela/paternità (fingerprinting individuale, Aurelle *et al.*, 1999) e la tracciabilità (San Cristobal *et al.*, 2000). Sono in grado di individuare le tracce di eventi demografici passati, tra cui l’introgressione, l’inbreeding e le variazioni nella grandezza effettiva della popolazione. Possono essere inoltre associati a patologie: nell’uomo le variazioni in ripetizioni della sequenza di un STR (mutazioni dinamiche) è

responsabile di almeno 2 malattie conosciute tra cui la sindrome dell'X fragile (Richards & Sutherland, 1992).

I marcatori **SNP** (*Single Nucleotide Polymorphism*) identificano principalmente mutazioni puntiformi, ma anche corte inserzioni e delezioni nella sequenza del DNA. Le mutazioni possono essere scoperte tramite sequenziamento, o con tecniche come la SSCP (*single strand conformation polymorphism*) che permette di visualizzare su gel le variazioni di singola base, o con strumenti come il DHPLC (Wolford *et al.*, 2000) che sfrutta la denaturazione e rinaturazione del DNA e il Maldi-TOF (*matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight*, Ross *et al.*). La tipizzazione degli SNP può essere molto veloce e automatizzata se si avvale di apparecchiature come DHPLC, Maldi-TOF e Pyrosequencing (Nordstrom *et al.*, 2000); tuttavia sono ancora molto sfruttate tecniche meno complesse, che si basano sulla PCR, quali la PCR-RFLP e il *minisequencing* (Pastinen *et al.*, 1997). Recentemente sono utilizzate inoltre tecnologie *highthroughput* per l'identificazione di centinaia di SNP simultaneamente, basate sulla fluorescenza come lo SNPlex (De La Vega *et al.*, 2005) o sull'ibridazione come il BeadArray (Shen R. *et al.*, 2005).

Gli SNP sono molto abbondanti (nell'uomo costituiscono più del 90% del polimorfismo totale), frequenti e distribuiti casualmente nel genoma. La maggior parte degli SNP risiede nelle regioni non codificanti in cui la probabilità di trovare una mutazione puntiforme è 4 volte maggiore rispetto a quella di trovarla in regioni codificanti (Twyman & Primrose, 2003). E' inoltre stato determinato che metà delle mutazioni presenti nelle sequenze espresse sono sinonime (non portano a cambiamenti nella sequenza aminoacidica). Gli SNPs sono considerati marcatori biallelici in quanto la probabilità che nella stessa posizione ci siano 2-3 cambiamenti di base è minima (nei mammiferi ogni

polimorfismo è generato da sostituzioni che avvengono con una ricorrenza di $1-5 \times 10^{-9}$ per anno) (Vignal *et al.*, 2002) e co-dominanti (consentono la discriminazione degli individui omozigoti da quelli eterozigoti). Sono utilizzati per studi evolutivi (Morin *et al.*, 2004), ma anche mappatura e associazione con QTL (Vignal *et al.*, 2002). Nell'uomo sono impiegati in studi di associazione con malattie (Rebbbeck *et al.*, 2004) e per la ricerca di geni sotto pressione selettiva (Sabeti *et al.*, 2002).

I marcatori **mitocondriali** sono generati tramite PCR e sequenziamento dei geni del DNA circolare che risiede nei mitocondri (mtDNA) (Luikart *et al.*, 2001). Il mtDNA è presente in centinaia di copie per cellula e viene ereditato per via materna senza subire ricombinazione. Evolve più velocemente del DNA nucleare e possiede una regione non codificante, detta *control region* (contenente il *displacement loop* o *D-loop* e l'origine di replicazione), che muta molto più rapidamente rispetto agli altri loci del mtDNA. Quindi l'evoluzione dei geni mitocondriali è molto più veloce di quella del DNA genomico (è stimato che il tasso di mutazione è 5-10 volte maggiore nel mtDNA) e varia da regione a regione. Per esempio i geni del DNA ribosomale sono altamente conservati e possono essere utilizzati per analisi filogenetiche di taxa superiori fino ai phyla; mentre le porzioni appartenenti al *D-loop* sono spesso utilizzati per studi sulla struttura di popolazioni e razze (per esempio per studiare la diversità e la "filogeografia" delle specie allevate, Sultana *et al.*, 2003). I marcatori mitocondriali sono stati utilizzati per identificare gli eventi di domesticazione (Bruford *et al.*, 2003); per esempio è stato possibile distinguere due separati episodi di domesticazione nel bovino (Loftus *et al.*, 1994) e multipli per il suino (Larson *et al.*, 2005) e determinare la struttura delle subspecie europee e africane *Bos taurus* e *Bos indicus* (Bradley *et al.*, 1996). Negli studi di popolazioni in cui sono diffusi i fenomeni di introgressione e di flusso genico mediato dagli

individui maschi, le analisi con i marcatori mitocondriali, che considerano l'eredità solo dal punto di vista della linea femminile, forniscono meno informazioni (MacHugh *et al.*, 1997).

I marcatori sul **cromosoma Y** vengono utilizzati per identificare la struttura geografica e l'evoluzione della popolazione maschile (Stumpf & Goldstein, 2001). Il cromosoma Y è specifico degli individui maschi, è costitutivamente aploide e non subisce ricombinazione (a causa dell'incapacità di eliminare gli alleli mutati tramite ricombinazione è caratterizzato da un alto tasso di mutazione), tranne che nella porzione terminale pseudoautosomale (Jobling *et al.*, 2004). La regione non ricombinante ha subito una espansione nel tempo fino a costituire nell'uomo circa il 90% dell'intero cromosoma Y che possiede dunque pochi geni (sono principalmente quelli che determinano il sesso) e una lunga porzione eterocromatica costituita per lo più da DNA satellite. Sono, come i marcatori mitocondriali, identificati principalmente con l'utilizzo di SNP, ma anche di microsatelliti (il chrY possiede regioni ricche di duplicazioni, SINE e retrovirus). Le mutazioni identificate come SNP sono in genere combinate in aplotipi (combinazione di alleli a due o più loci strettamente associati su un cromosoma e generalmente ereditati come unità) e spesso in aplogruppi (nell'uomo sono stati identificati 153 aplogruppi definiti da marcatori binari). Sono quindi utili per studi evolutivi, di filogeografia e di genealogia (Jobling & Tyler-Smith, 2003).

Una tecnologia molto utilizzata nello studio e nell'individuazione di mutazioni negli animali domestici è la **PCR-RFLP** (Haliassos *et al.*, 1989), che consiste nell'amplificazione di frammenti specifici tramite PCR e successiva digestione con enzimi di restrizione. Un esempio è quello delle mutazioni del gene MC1R (*melanocortin 1 receptor*), che in molte specie domestiche (cavallo,

bovino, pecora, cane, suino e pollo, Andersson, 2001) e non (uomo, topo) provocano variazioni nel colore del mantello, dei peli (o capelli) e della pelle. Nel cavallo per esempio gli individui con fenotipo omozigote E^e (sauro, portatori della mutazione) e recessivo (non sauro) possono essere identificati con un semplice test di PCR-RFLP in quanto la mutazione crea un sito riconosciuto dall'enzima *TaqI* (Marklund *et al.*, 1996).

1.8 AFLP

I marcatori molecolari AFLP sono marcatori molto utilizzati soprattutto in genetica vegetale (Subudhi *et al.*, 2005, Herrmann *et al.*, 2005) e batterica (Wieland *et al.*, 2005, Fry *et al.*, 2005) e sfruttati negli ultimi anni anche per lo studio della diversità animale (Ajmone Marsan *et al.*, 1997). Questa tecnologia permette di visualizzare centinaia di frammenti simultaneamente che rappresentano loci distribuiti casualmente lungo il genoma.

La tecnologia AFLP può essere schematizzata in quattro passaggi (Ajmone Marsan *et al.*, 1997):

1) Digestione

Il DNA viene digerito con due enzimi di restrizione: il *rare cutter* (taglia con bassa frequenza e ha un sito di riconoscimento di 6 bp) e il *frequent cutter* (taglia frequentemente e ha un sito di riconoscimento di 4 bp). Nei mammiferi generalmente vengono utilizzati *EcoRI* (*rare cutter*, 5'-GAATTC-

3') e *TaqI* (*frequent cutter*, 5'-TCGA-3');

2) Ligazione

Adattatori sintetici di sequenza nota (disegnati per essere complementari al sito di taglio, ma senza ricostruirlo) vengono legati all'estremità dei frammenti di restrizione sfruttando le proprietà dell'enzima ligasi e formando il cosiddetto templatato;

3) Preamplificazione

Il templatato diluito viene sottoposto a una prima amplificazione utilizzando inneschi complementari agli adattatori con 1 nucleotide selettivo all'estremità 3'

4) Amplificazioni selettive (AFLP);

Il preamplificato diluito viene sottoposto a una seconda amplificazione con primer che possiedono 2 nucleotidi selettivi in più rispetto a quelli utilizzati per la preamplificazione (il primer complementare agli adattatori possiede così 3 nucleotidi all'estremità 3'), necessari per ridurre il numero di frammenti amplificati. Uno dei due *primer* (in genere il *rare cutter*) per poter essere successivamente rilevato, può essere marcato con un tracciante radioattivo (^{33}P) o con metodi di fluorescenza; la marcatura di uno solo dei due primer comporta la minor complessità in fase di rilevazione, in quanto solo uno dei due filamenti viene visualizzato;

5) Separazione dei frammenti

I frammenti amplificati e marcati vengono separati tramite elettroforesi su matrice di poliacrilammide e rilevati utilizzando una lastra

autoradiografica. E' possibile utilizzare una colorazione silver-staining per visualizzare il profilo elettroforetico, senza aver effettuato alcuna marcatura.

I frammenti di DNA prodotti dalla tecnologia AFLP variano in lunghezza e in numero a seconda della combinazione dei primer (complementari agli adattatori) e i profili ottenuti sono specie-specifici. Il numero di frammenti cresce con l'aumento della grandezza del genoma e il profilo varia a seconda del tipo e numero di nucleotidi selettivi aggiunti al primer (ogni profilo prodotto utilizzando entrambi i primer con un nucleotide selettivo in più è un *subset* di quello originale, diminuisce di 1/16 la complessità).

Il polimorfismo è determinato dalla presenza o assenza delle bande AFLP (ogni banda polimorfica rappresenta il marcatore a un locus): la codifica è binaria e generalmente la presenza di un frammento di una certa lunghezza (presenza dell'allele) in una matrice di dati ha punteggio 1, mentre l'assenza ha punteggio 0. Gli AFLP vengono utilizzati principalmente come marcatori dominanti per cui il marcatore a cui viene assegnato un punteggio 1 può essere sia in omozigosi (1/1) che in eterozigosi (1/0) (Bensch & Akesson, 2005).

Le applicazioni della tecnologia in ecologia molecolare sono diverse: analisi di parentela (Krauss, 1999, Questiau *et al.*, 1999), variabilità genetica (Sivasundar & Hey, 2003), struttura della popolazione (Wang *et al.*, 2004), assegnamento di individui (Mueller & Wolfenbarger, 1999), ricerca di geni che influenzano il fenotipo (Wilding *et al.*, 2001), identificazione di ibridi interspecifici (Congiu *et al.*, 2001), *mapping* (Becker *et al.*, 1995), analisi di *linkage* (Van Haeringen *et al.*, 2001) e studi di filogenesi.

Le caratteristiche peculiari della tecnologia AFLP sono (Salvelkoul *et al.*, 1999):

- elevata ripetibilità
- robustezza dell'analisi
- potere discriminante (di razze, specie, ceppi e individui)

Gli AFLP sono generalmente considerati dominanti, quindi l'informazione ottenuta (per ogni locus) con questo tipo di marcatori è bassa, rispetto ad esempio a quella ottenuta dai microsatelliti. I marcatori dominanti sono soggetti a distorsione (*bias*) nella stima dei parametri genetici, per esempio non è possibile calcolare l'eterozigosità osservata e quindi stabilire se i loci sono in equilibrio di *Hardy-Weinberg*. Mariette *et al.* ha prodotto test statistici per individuare se i marcatori dominanti (AFLP) e non (microsatelliti) stimano correttamente la diversità all'interno delle popolazioni (2002). Gli AFLP risultano essere efficienti nell'analisi della diversità a livello dell'intero genoma se la popolazione analizzata è sottoposta a basso flusso genico ed è caratterizzata da alta eterogeneicità. Sono comunque necessari almeno 4 volte più marcatori AFLP per ottenere la stessa precisione nella stima della variabilità che si ha utilizzando i marcatori co-dominanti ipervariabili (microsatelliti).

Alcune mutazioni (inserzioni e delezioni) possono portare alla formazione di 2 o più frammenti di diversa lunghezza per cui due frammenti dello stesso locus sono rappresentati da due bande a diversa altezza; quando invece due frammenti della stessa lunghezza sono in realtà due diversi loci AFLP si parla di omoplasia. Sia l'omoplasia nelle dimensioni dei frammenti che la difficoltà nel discriminare i loci determinano una sottostima della diversità genetica entro e tra popolazioni (Vekemans *et al.*, 2002). Il livello di omoplasia dipende dalla lunghezza dei frammenti amplificati (la probabilità di trovare due bande AFLP non omologhe è maggiore se queste sono corte) e dalla divergenza tassonomica

(tra parenti è stata calcolata una percentuale del 2.5%, mentre tra taxa superiori può arrivare al 100% delle bande totali) (O'Hanlon & Peakall, 2000)

Per minimizzare l'effetto dell'omoplasia quindi è preferibile leggere l'informazione data dai frammenti di dimensioni maggiori (Vekemans *et al.*, 2002), inoltre l'utilizzo dell'enzima *Taq I* facilita l'ottenimento di frammenti più lunghi perché ha un sito di riconoscimento che contiene tutti e 4 i nucleotidi (la sua attività non è influenzata dalla presenza nel genoma di regioni ricche di AT o GC, come avviene invece per l'enzima *Mse I*).

1.9 Capra hircus

1.9.1 Importanza e distribuzione geografica

La capra domestica (*Capra hircus*) è la specie allevata attualmente più diffusa in quanto dotata di elevata adattabilità alle condizioni climatiche e geografiche estreme (sopravvive in ambienti aridi e caldi come i deserti dell'Africa e in zone molto fredde come le montagne siberiane) ed è facilmente trasportabile (Haenlein, 2001).

Uno studio approfondito riguardante caratteristiche di adattabilità ambientale (per esempio tolleranza al freddo e al caldo) è stato compiuto da Haenlein (2001) su razze di capre, pecore e bovini. Il risultato ha evidenziato una maggiore capacità di adattamento della capra, soprattutto rispetto agli altri due bovidi; per esempio può sopravvivere con meno apporto di acqua e in condizioni climatiche più estreme.

Tutte queste caratteristiche hanno determinato la diffusione della capra in quei paesi in cui è più difficile l'allevamento di bovidi di grandi dimensioni o meno adattabili. Le capre costituiscono la fonte di sostentamento umano principale nei paesi in via di sviluppo e dove sono presenti carenze di proteine, calcio e vitamine; sono inoltre importanti per la produzione di pellame e fibra. Le razze caprine producono latte caratterizzato da maggior contenuto in vitamine e sali minerali e maggiore digeribilità rispetto a quello di vacca; il suo consumo si sta diffondendo nei paesi sviluppati come alternativa al latte bovino. L'allevamento caprino è importante anche per l'economia delle aree marginali di paesi Europei: ne sono un esempio le Alpi e le isole del sud Italia, i Pirenei e la Corsica in Francia, le montagne e le isole della Grecia, il sud e la regione Andalusia in Spagna.

1.9.2 Domesticazione

Tra le 50000 specie di mammiferi e uccelli presenti in natura solamente 40 di queste sono state addomesticate e solo una dozzina sono attualmente allevate. Tra i 148 grandi erbivori (del peso maggiore di 45 kg) solo 14 sono stati addomesticati e la maggior parte di essi in Europa e Asia (solo uno, il lama, in America, Mignon-Grasteau *et al.*, 2005). Il motivo di un così esiguo numero di specie domestiche è probabilmente dovuto al fatto che solo poche specie hanno le caratteristiche ottimali di comportamento, docilità e riproduttività ideali per la sopravvivenza in cattività. La scelta è ricaduta su specie (per esempio quelle della famiglia dei bovidi) con determinate caratteristiche etologiche (animali mansueti che vivono in branco e riconoscono un capo-branco), alta riproduttività e alimentazione erbivora. Ma non su tutti i bovidi è stato possibile attuare il processo di domesticazione: per esempio la gazzella è difficile da mantenere in cattività e l'antilope è troppo agile per poter essere

controllata e gestita. Attraverso i meccanismi di selezione artificiale (Innan & Kim, 2004) l'uomo ha selezionato i pool genici per poter ottenere le specie con le migliori caratteristiche di produttività (poche specie riescono a soddisfare i fabbisogni di tutta l'umanità), uniformità, riproduzione e docilità. La selezione artificiale attua un processo di "scelta" che non è dipendente dalla fitness o dalla migliore capacità di adattamento della popolazione (come avviene nella selezione naturale) ma dalle varianti fenotipiche.

La domesticazione della specie *Capra hircus* risale a circa 10,000 anni fa nella regione medio orientale detta mezzaluna fertile che si estende dal sudest della Turchia al nord della Siria, e comprende i Monti Zagros e le pianure dell'Iraq e dell'Iran (Zeder & Hesse, 2000). Questa zona rappresenta la culla della domesticazione: i primi bovidi ad essere addomesticati sono stati le pecore e le capre, successivamente i bovini e i suini (Pringle, 1998). Studi molecolari (con marcatori sul mtDNA che considerano solo l'eredità materna) hanno evidenziato che la specie selvatica più prossima alla capra domestica è la *Capra aegagrus* (Mannen *et al.*, 2001).

Nel lavoro di Luikart *et al.*, il DNA mitocondriale (*control region*) di razze caprine (popolazioni native di aree rurali marginali, e 4 specie selvatiche appartenenti al genere *Capra*) ha permesso di distinguere tre aplogruppi (aplotipi che condividono un set di mutazioni specifiche derivato da un antenato comune): quello più rappresentato A e i gruppi B e C (2001). Sorprendentemente tutte le razze analizzate appartenevano all'aplogruppo A (406 individui provenienti da 44 paesi campionati in Europa, Asia, Africa e vicino-medio oriente), mentre l'aplogruppo B è stata identificato solo nel sud-est asiatico e l'aplogruppo C in Mongolia, Svizzera e Slovenia. Si può supporre che queste tre linee non derivino da una singola popolazione selvatica, ma da

diverse popolazioni domesticate in maniera indipendente e che quindi esistano altre zone di origine della domesticazione oltre quella della Mezzaluna Fertile. I dati archeologici più recenti supportano la teoria per cui siano esistiti almeno 4-5 siti di domesticazione per le capre (che comprendono le zone della Mezzaluna Fertile, del Bacino Indiano e dell'Asia Centrale).

1.9.3 Variabilità genetica nelle capre: stato dell'arte

I primi lavori sullo studio della variabilità genetica delle capre sono stati effettuati utilizzando marcatori fenotipici che descrivevano caratteri qualitativi come i profili genetici visibili (Crepaldi *et al.*, 1999) e i tratti morfologici (Herrera *et al.*, 1996), o quantitativi, come le proteine del latte (Ramunno *et al.*, 1994) e del sangue (Pépin & Ngujen, 1994). Negli ultimi 15 anni queste analisi sono state quasi completamente sostituite da quelle che sfruttano i marcatori molecolari: allozimi (Rodero *et al.*, 1997), microsatelliti (Saitbekova *et al.*, 1999) e mtDNA (Luikart *et al.*, 2001).

La biodiversità delle razze di capre presenti in diversi paesi europei ed extra europei (dal Portogallo, all'Italia, alla Cina fino al Pakistan) è stata oggetto di una varietà di studi molecolari.

L'analisi del DNA mitocondriale delle razze locali portoghesi (Pereira *et al.*, 2005) ha evidenziato una elevata variabilità (in ogni razza il 61-76% degli aplotipi risulta diverso rispetto agli altri). Le razze native del Portogallo sono significativamente differenti tra loro (anche se la variabilità maggiore è quella entro-razza, 96.65%) e si possono raggruppare negli aplogruppi A e C. L'analisi della correlazione delle distanze genetiche con la distribuzione geografica degli animali ha dato esito negativo (questo fenomeno può essere dovuto alla

presenza di una elevata complessità nel pool iniziale capre femmine e/o alla introduzione di animali femmine non native).

Lo studio di capre pakistane (tramite sequenziamento del *D-loop* e del gene per il citocromo b del mtDNA) ha mostrato l'esistenza di un quarto aplogruppo indicato come D, che comprende 3 aplotipi appartenenti alle popolazioni tipiche di quella zona dell'Asia (Sultana *et al.*, 2003). L'analisi di 12 capre locali cinesi (Li *et al.*, 2002) in via di estinzione (tra cui quelle tibetane) con 17 microsatelliti ha permesso di evidenziare una bassa variabilità entro razza spiccata nelle popolazioni poco numerose e soggette a isolamento geografico. Inoltre è stato possibile determinare una distribuzione della variazione genetica tra le popolazioni secondo un gradiente geografico.

I microsatelliti sono stati utili per l'analisi della variabilità delle popolazioni di *Capra hircus* svizzere (Saitbekova *et al.*, 1999) e nel confronto tra quelle francesi e marocchine (Ouafi *et al.*, 2002). Lo studio delle popolazioni caprine svizzere (8 razze e 251 individui) con marcatori STR (Saitbekova *et al.*, 1999) ha rilevato un alto livello di loci monomorfici (rispetto a popolazioni selvatiche utilizzate nell'analisi come la *Capra ibex* e la *Capra aegagrus*) e una netta separazione di queste due specie rispetto a quelle svizzere. Solo il 17% della variabilità totale è da attribuire alla differenza tra razze (presenza di un elevato flusso genico tra le popolazioni svizzere) e in base alle distanze genetiche non è stato possibile distinguere chiaramente le popolazioni di *Capra hircus* esaminate. E' stata analizzata la diversità genetica di due razze di capre marocchine e delle razze allevate in Francia (in parte cosmopolite e in parte locali, come quella dei pirenei) con 5 microsatelliti (Ouafi *et al.*, 2002). La razza dei pirenei è risultata quella più vicina alle popolazioni marocchine che presentano il più alto numero di alleli per locus (l'Alpina e la Saanen, che sono

razze cosmopolite, presentano invece il minor numero medio di alleli per locus).

Lo studio delle relazioni tra 11 popolazioni di capre asiatiche (Twyman & Primrose, 2003) con proteine del sangue e microsatelliti ha evidenziato un elevato eccesso di omozigoti. La presenza di marcatori in omozigosi può essere spiegata in diversi modi: presenza di alleli nulli (per i microsatelliti), effetti Wahlund, errori nel conteggio, selezione contro gli eterozigoti o inbreeding. L'effetto Wahlund è dovuto all'errore che si genera campionando casualmente le popolazioni che hanno una sottostruttura e provoca una valutazione scorretta della composizione e della frammentazione delle popolazioni. Essendo le razze analizzate soggette a diminuzione nella dimensione effettiva della popolazione (N_e) e ad accoppiamenti tra parenti, è stato ipotizzato che la causa principale della perdita degli eterozigoti fosse dovuta all'inincrocio.

Studi sono stati effettuati su altre specie caprine, per esempio la *Capra pyrenaica* (o spanish Ibex, Amills *et al.*, 2004) è stata analizzata utilizzando microsatelliti e i geni del MHC. In base ai marcatori genetici e neutri è stata riscontrata una bassa variabilità genetica e valori di eterozigosità attesa e osservata tipiche delle popolazioni che sono state soggette a "colli di bottiglia".

La biodiversità delle razze caprine italiane è stata oggetto di diversi studi, soprattutto riguardanti la variabilità genetica e la conservazione delle popolazioni native e locali.

Lo studio di razze locali italiane a rischio di estinzione (Adamello, Orobica, Verzaschese, Frisa e Val di Livo, Sarda) con marcatori AFLP (Ajmone Marsan *et al.*, 2001) ha messo in evidenza differenze molecolari tra le popolazioni primarie (Val di Livo e Sarda) e quelle standardizzate. La maggior

parte della diversità è distribuita all'interno delle razze (la razza Sarda possiede un elevato livello di variabilità) mentre tra di loro la differenza è solo dell'11%. Questo risultato sottolinea come le divergenze morfologiche tra le razze siano controllate da un numero limitato di geni (non rilevabili con marcatori neutri) e come probabilmente nel recente passato le razze analizzate abbiano subito fenomeni di flusso genico.

Nel lavoro di Luikart *et al.* (2001) è stato messo in evidenza, attraverso l'analisi della varianza molecolare (AMOVA) dei dati derivanti dall'analisi con il mtDNA, che nelle capre solo il 10% della variabilità è distribuita tra i continenti; al contrario della situazione del bovino (>50%) e della pecora (35%). Ciò indica una bassa struttura filogeografica delle popolazioni (elevato flusso genico anche tra razze presenti in diversi continenti) e fa supporre che le capre, più delle pecore e dei bovini, abbiano avuto un ruolo importante nella storia della colonizzazione, del commercio e della migrazione umana e siano state presenti nei passaggi migratori in cui avvenivano i maggiori scambi commerciali.

Studiando la diversità genetica con marcatori AFLP (Ajmone-Marsan *et al.*, 2001) delle razze caprine italiane rispetto a quelle asiatiche e africane sono stati confermati i dati di Luikart ottenuti con i microsatelliti che mostravano un abbassamento della variabilità allontanandosi dal centro di domesticazione ed evidenziati, sorprendentemente, valori di eterozigosità maggiori nelle specie alpine e turche rispetto a quelle asiatiche e africane. Un'altra evidenza interessante di questo lavoro è l'ottenimento di una struttura genetico-geografica delle razze caprine analizzate che non era emersa con l'analisi sul mtDNA. Grazie all'utilizzo di marcatori genomici e biparentali AFLP è stato possibile individuare anche l'"effetto paterno" a livello di variabilità genetica.

Infatti i marcatori neutri permettono di analizzare il genoma nella sua totalità, mentre i marcatori presenti sul mitocondriale forniscono informazioni sulla variazione genetica della sola linea materna.

1.10 Progetto ECONOGENE

Il progetto europeo ECONOGENE è stato costruito all'interno del V° programma quadro "Qualità della vita" (http://europa.eu.int/comm/research/quality_of-life.html), con lo scopo di contribuire allo sviluppo dell'agricoltura Europea sostenibile attraverso la promozione delle risorse genetiche dei piccoli ruminanti (capre e pecore) nelle aree rurali marginali. Il consorzio ECONOGENE comprende 12 *partners* e 11 *subcontractors* provenienti da paesi europei e non. Pecore e capre sono specie di interesse perché tipiche delle aree marginali a basso impatto tecnologico. Nel progetto sono state esaminate 57 razze di pecora e 47 di capra provenienti dai principali ambienti estremi di Europa, Medio oriente e nord Africa. Il progetto europeo ECONOGENE si pone l'obiettivo di esaminare queste razze sotto diversi aspetti: socio-economico, genetico e geostatistico. La variabilità genetica è stata studiata attraverso marcatori molecolari mitocondriali, del cromosoma Y, microsatelliti, AFLP e SNP. L'analisi di diverse regioni del genoma ha permesso di avere una stima globale della diversità genetica sia a livello di specie che di popolazioni. Grazie a queste informazioni è stato possibile determinare le razze che hanno una maggiore perdita di variabilità e le priorità di conservazione in una specifica area geografica costruendo, anche in base ai dati demografici, mappe di conservazione. Sovrapponendo le mappe di priorità

di conservazione e di prospettive di sviluppo (create in base ad aspetti economici) possono essere identificate le aree in cui lo sviluppo sostenibile di una determinata popolazione ha maggior possibilità di successo rispetto ad un'altra all'interno della stessa area. L'obiettivo finale è quello di stimare la biodiversità e valutarla da un punto di vista economico per poter suggerire piani di azione riguardanti la conservazione delle razze o delle popolazioni all'interno di un area.

Lo scopo di promuovere la conservazione sostenibile delle risorse in capre e pecore viene effettuato attraverso:

- l'identificazione delle popolazioni più distintive della specie *Capra hircus* analizzando la diversità genetica e genomica a diversi livelli (marcatori neutri, sequenze espresse, linee materne e paterne) poco studiate e localmente importanti e presenti nelle aree marginali dell'Europa, del Medio Oriente e del Nord-Africa;
- la determinazione del valore economico delle risorse genetiche integrando i dati economici e demografici (per es. la prestazione, la gestione, il mercato del prodotto e l'uso della terra) grazie a informazioni sul grado della distinzione genetica di queste razze;
- l'identificazione delle aree dove le azioni di promozione dello sviluppo rurale attraverso la conservazione delle popolazioni maggiormente preziose possono avere maggior successo.

Per raggiungere questi obiettivi il progetto è organizzato in piani di lavoro che consistono in:

- preparazione di database dei dati raccolti dalle diverse risorse;
- implementazione delle interfacce che permettono un facile accesso da parte dei partners ai dati e alle analisi, permettendo lo scambio di informazioni e il monitoraggio in tempo reale degli avanzamenti del progetto;
- raccolta di campioni biologici per le analisi molecolari;
- registrazione delle posizioni GPS dei campioni;
- raccolta delle informazioni sulla gestione delle razze;
- raccolta di dati descrittivi ed economici sulle razze e socio-economici sulle aree rurali;
- studio dell'efficacia delle applicazioni delle misure CAP (Common Agricultural Policy);
- sviluppo di modelli per la valutazione economica delle risorse genetiche;
- analisi genetica e genomica delle risorse genetiche;
- analisi di tutti i dati genetici, socio-economici e geografici raccolti usando l'informazione geografica;
- proposte di azioni specifiche capaci di promuovere lo sviluppo sostenibile di capre e pecore nelle aree ad alta priorità di conservazione;
- indicazione dei sistemi di gestione che soddisfano il mantenimento della biodiversità e dell'originalità delle popolazioni locali.

Sono sfruttati sistemi di geostatistica (il GIS, *Geographic information system*) per integrare i dati geografici, genetici e socio-economici. L'uso delle informazioni geografiche permette di (Joost *et al.*, 2005):

- mostrare i valori di diversità nelle mappe per stimare potenziali pattern territoriali
- comparare e correlare i valori provenienti da diversi marcatori molecolari con le posizioni geografiche
- aiutare l'identificazione di geni sotto selezione

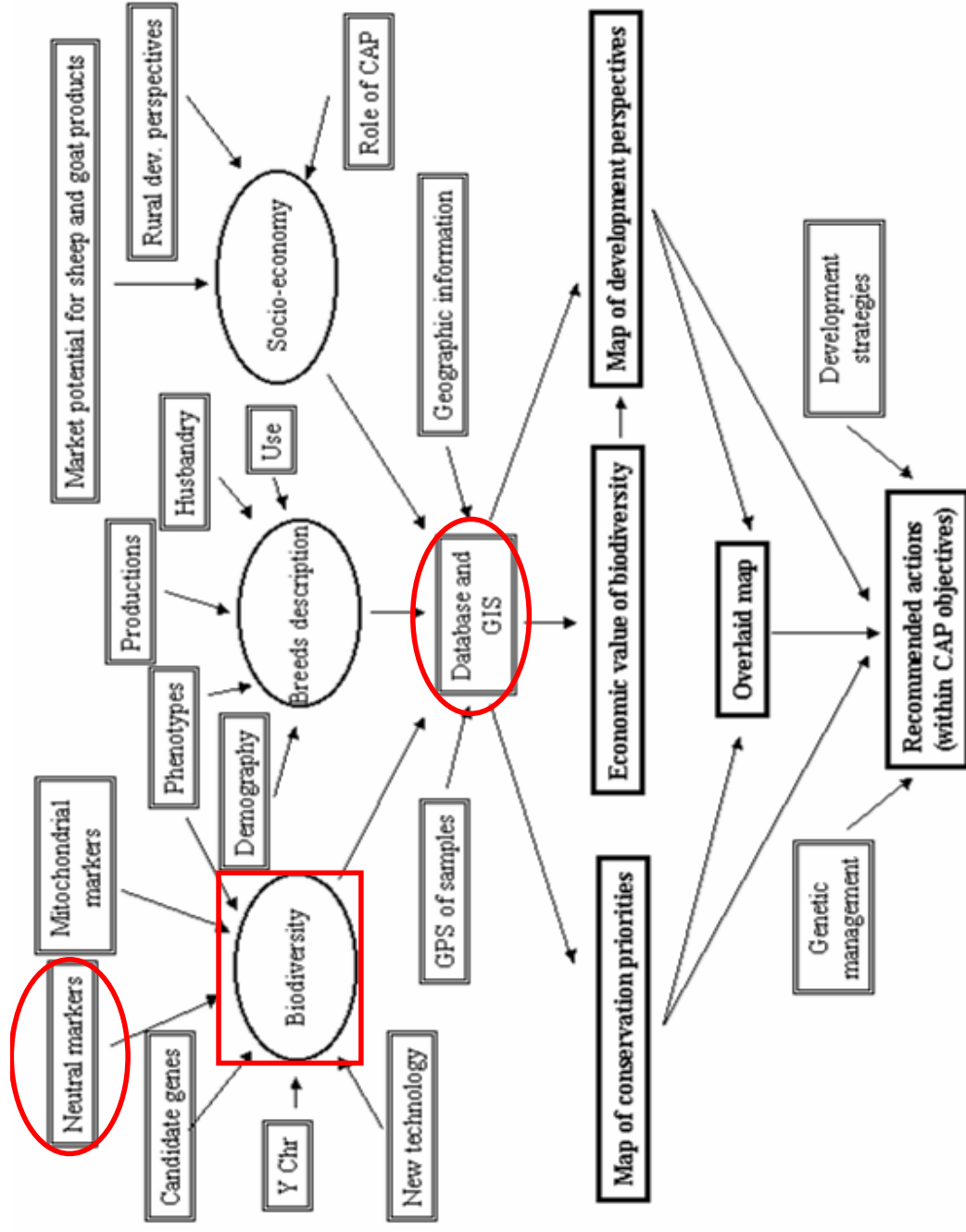


Figura 1.1: Organigramma che rappresenta il legame tra le discipline coinvolte nel progetto ECONOGENE.

2. Materiali e metodi

2.1 Le razze caprine europee

Le razze caprine possono essere suddivise in tre gruppi, che presentano caratteri differenziali ben distinguibili:

- Razze Alpine o Europee con fronte larga e corna di medio sviluppo rivolte all'indietro o assenti in ambo i sessi, di cui fanno parte le razze svizzere (Saanen, Toggenburg, Camosciata, ecc.), le razze tedesche (Harz, Turingia, Selva Nera, ecc.), le razze Francesi (di Poitou, dei Pirenei, Mont d'Or, ecc.) e tutte le capre che popolano le Alpi e l'Europa centrale e settentrionale;
- Razze africane o mediterranee: di cui fanno parte la Maltese, la Nubiana dell'Africa nord-orientale (comprese le coste del Mar Rosso), l'Egiziana, dotate di grande attitudine alla produzione di latte, la capra nana della Somalia dal mantello camosciato, la capra della Libia e la capra dell'Eritrea, tutte caratterizzate da mole modesta, assenza di corna (salvo eccezioni in pochissime razze nelle quali però le corna presenti hanno scarso sviluppo) e mammella ben sviluppata;
- Razze asiatiche: alle quali appartengono la capra d'Angora, dal mantello bianco purissimo (raramente scuro), dal vello lungo e sericeo detto "mohair", e la capra del Kashemir, allevata nel gruppo dell'Himalaya, della quale viene utilizzato il sottovello morbidissimo per produrre notissimi filati.

2.1.1 Razze caprine campionate

Le razze utilizzate per il campionamento appartengono al gruppo Europeo, suddiviso in nord Europa e bacino del Mediterraneo, e Africano (comprendente la zona della Mezzaluna Fertile). I paesi coinvolti nel campionamento sono: Svizzera, Germania, Austria, Polonia, Romania e Ungheria (centro-est Europa), Portogallo, Spagna, Francia, Italia, Albania, Grecia e Turchia (sud Europa) e Giordania e Arabia Saudita (vicino Oriente) come descritto nella tabella 2.1 e visualizzato nella figura 2.1. Sono state collezionate 47 popolazioni di capre, di cui 43 autoctone e come controllo è stata campionata la razza cosmopolita *Swiss Alpine* in doppio in Svizzera (il luogo di origine della razza) e in altri paesi dove è allevata (Germania, Italia e Francia). In Italia la razza è nota come Camosciata delle Alpi.

Razze	Paese
<i>Abaza</i>	Turchia
<i>Angora</i>	Turchia
<i>Argentata dell'Etna</i>	Italia
<i>Baladie</i>	Giordania
<i>Beeshi</i>	Arabia Saudita
<i>Bionda dell'Adamello</i>	Italia
<i>Bravia</i>	Portogallo
<i>Camosciata</i>	Italia
<i>Capore</i>	Albania
<i>Carpathian goat</i>	Romania
<i>Corse</i>	Francia
<i>Dukati</i>	Albania
<i>Florida</i>	Spagna
<i>French Alpine</i>	Francia
<i>German Alpine</i>	Germania
<i>Girgentana</i>	Italia
<i>Greek goat</i>	Grecia
<i>Grigia molisana</i>	Italia
<i>Grisons striped</i>	Svizzera
<i>Guadarama</i>	Spagna
<i>Gurcu</i>	Turchia
<i>Hair</i>	Turchia
<i>Hasi</i>	Albania

<i>Hungarian native</i>	Ungheria
<i>Liquenasi</i>	Albania
<i>Malagueña</i>	Spagna
<i>Mati</i>	Albania
<i>Muzhake</i>	Albania
<i>Najrani</i>	Arabia Saudita
<i>Orobica</i>	Italia
<i>Payoya</i>	Spagna
<i>Peacock goat</i>	Svizzera
<i>Pinzgau</i>	Austria
<i>Polish fawn coloured goat</i>	Polonia
<i>Pyrenean</i>	Francia
<i>Rove</i>	Francia
<i>Sarda</i>	Italia
<i>Skopelos</i>	Grecia
<i>St. Gallen booted goat</i>	Svizzera
<i>Swiss Alpine I</i>	Svizzera
<i>Swiss Alpine II</i>	Svizzera
<i>Tauern Pied</i>	Austria
<i>Thuringian forest goat</i>	Germania
<i>Valais black neck</i>	Svizzera
<i>Valdostana</i>	Italia
<i>Verata</i>	Spagna
46 razze	15 paesi

Tabella 2.1: Razze campionate e rispettivi paesi di origine.

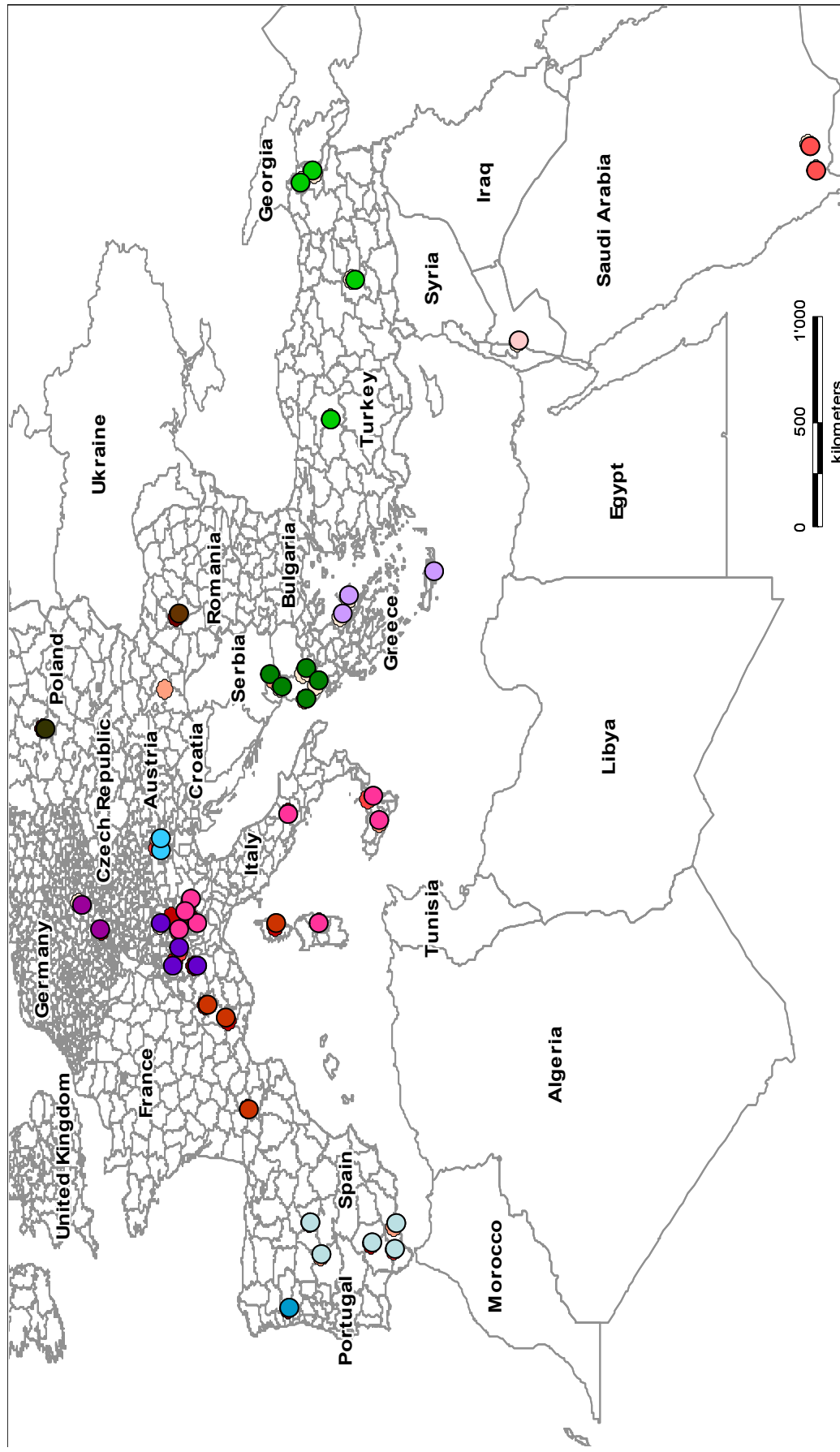


Figura 2.1: distribuzione geografica delle razze campionate; il colore diverso è comune alle razze appartenenti allo stesso paese di origine.

2.1.2 Criteri usati per il campionamento

I criteri su cui si è basata la raccolta dei campioni sono stati:

- 33 animali non imparentati per razza
- Non più di 3 animali prelevati per allevamento, dalla più ampia area possibile di origine della razza
- Animali adulti se possibile

Il materiale biologico collezionato da ciascun animale è stato raccolto in quantità tale da potere estrarre almeno 20 microgrammi di DNA. Principalmente è stato prelevato sangue (circa 20 ml in vacutainer contenenti EDTA o citrato di Na come anticoagulante) che immediatamente è stato congelato a cui è stato aggiunto uno stesso volume di una soluzione di conservazione (DNA Solution® storage Buffer, che permette il mantenimento a temperatura ambiente). Nel caso in cui non è stato possibile prelevare sangue è stato campionato tessuto (100-200 mg) prelevato dalla zona auricolare e conservato in etanolo 95%) oppure i peli avendo cura di prelevarli con il bulbo.

Ad ogni animale è stato assegnato un codice alfanumerico identificativo di 9 caratteri così composto: le prime due lettere identificano la specie, le seconde due il paese di provenienza (utilizzando la nomenclatura UE), le successive 3 indicano la razza e le ultime 2 cifre il numero progressivo del campione (per esempio il quinto animale campionato appartenente alla razza caprina italiana Bionda è indicato come ChITBIO05).

Per ogni animale campionato è stato compilato un questionario dettagliato, in cui veniva annotato:

- Il codice ECONOGENE identificativo dell'animale e il codice identificativo dell'azienda;
- Alcune informazioni sull'animale e sul campionamento (sesso, anno e luogo di nascita, data di raccolta e nome del campionario);
- Alcune informazioni sull'allevamento di provenienza;
- Il tipo di materiale biologico campionato;
- Le coordinate GPS (longitudine, latitudine e altitudine) del luogo di campionamento;
- La fotodocumentazione (almeno una foto per animale con a fianco una unità di misura, appendice A).

Inoltre sono stati compilati questionari dettagliati per la raccolta di informazioni sulle aziende campionate (contenenti ad esempio i dati di performance e il numero degli animali riproduttori), la regione di campionamento e le condizioni socio-economiche (vedi appendice B).

2.2 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando principalmente kit commerciali: Roche® high pure PCR template preparation kit; Macherey-Nagel kit, Sigma GenElute Mammalian Genomic DNA kit; QIAGEN Blood & Cell Culture DNA kit, e il procedimento ha seguito le indicazioni fornite dai protocolli specifici delle diverse case produttrici. Per far fronte a campioni difficoltosi, a materiale scarso o con basso grado di purezza si è optato per l'utilizzo di un protocollo CTAB (esadeciltrimetilammonio bromuro) messo a punto secondo le necessità.

In generale il protocollo di estrazione organica CTAB prevede di partire da 5 ml di sangue scongelato (a temperatura ambiente o in bagnetto a 37°C). Si procede a una prima centrifugazione a 3500xg per 15' in presenza di ugual volume di PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,4 in modo da separare il plasma dalla fase corpuscolare (ricca di linfociti ed eritrociti) e una seconda centrifugazione a 3500xg per 5' a temperatura ambiente dopo aggiunta di 2 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) per eliminare gli eritrociti che non essendo nucleati nei mammiferi non contengono DNA. L'operazione è stata ripetuta fino a quando non si è ottenuta la completa eliminazione dell'emoglobina presente nel surnatante (ricco di eritrociti e di residui cellulari) dal *pellet*, costituito dai linfociti.

A lavaggi ultimati si sono aggiunti al *pellet* di cellule 2 ml di Buffer KL (Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 2 mM NaCl 0.4 M) e 50 ul di proteinasi K (20 mg/ml), e dopo aver vortexato si è proceduto a incubare per 2 ore a 52°C in un bagno termostato. Dopo l'incubazione si è aggiunto 4 ml di soluzione 2X CTAB (200 mM Tris pH 7.5, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 g/l CTAB) pre-riscaldata a 60°C e 100 µl di β-mercaptoetanolo puro. Il CTAB ha azione lisante sulle cellule e denaturante sulle proteine, mentre il β-mercaptoetanolo ha azione antiossidante. Dopo aver miscelato, si è lasciato in incubazione a 60°C per 1 h.

Terminato l'ultimo passaggio, si sono aggiunti 3 ml di cloroformio-ottanolo 24:1 (v/v) e si è miscelato capovolgendo i tubi per 10', fino all'ottenimento di un'unica emulsione. Si è quindi centrifugato a 16000xg per 15', a temperatura ambiente. A centrifugazione ultimata si è potuta osservare la formazione di due fasi separate da un'interfase più o meno spessa, formata da proteine denaturate. Si è prelevato il surnatante e lo si è trasferito in un tubo

sterile, avendo cura di non prelevare l'interfase formata da proteine, nè parte della fase organica sottostante. I passaggi dell'estrazione con cloroformio-ottanolo vengono ripetuti fino a quando, dopo la centrifugazione, non è più presente un'interfase visibile fra fase organica e fase acquosa.

Il surnatante raccolto dopo l'ultima centrifugazione viene trasferito in un tubo da 15 ml sterile a cui sono aggiunti 30 µl di una soluzione di RNaseA (50 mg/µl). Dopo l'incubazione per 1 h a 37°C per degradare l'RNA eventualmente presente nell'estratto, il DNA viene precipitato aggiungendo un eguale volume di isopropanolo

L'azione disidratante dell'isopropanolo, combinata con l'azione di neutralizzazione delle cariche negative presenti sulla molecola del DNA da parte dei cationi presenti in soluzione, provoca la precipitazione degli acidi nucleici. È importante utilizzare un rapporto fra surnatante e isopropanolo di 1:1 (v/v) per promuovere unicamente la precipitazione del DNA, mantenendo in soluzione sostanze, come i polisaccaridi, che potrebbero ostacolare i successivi trattamenti del DNA purificato.

Si è proceduto quindi ad una prima centrifugazione a 16000xg per 10', con la quale il DNA precipitato viene raccolto sul fondo della provetta permettendo così l'eliminazione del surnatante. Al *pellet* di DNA sono stati quindi aggiunti 1 ml di una soluzione al 76% di EtOH, 0.2 M Acetato di sodio (NaOAc) e si è messo in incubazione a temperatura ambiente per 20' circa per facilitare l'eliminazione dei sali in eccesso. Si è ricentrifugato nuovamente a 16000xg per 10', si è separato il *pellet* dal surnatante e si è sottoposto il DNA ad un secondo lavaggio e ad una seconda centrifuga ed è stato eliminato il surnatante.

Il pellet è stato incubato a temperatura ambiente per circa 20-30' e risospeso in 200 µl di soluzione TE 1X (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

La valutazione della qualità e della quantità del DNA estratto è stata eseguita sottoponendo i campioni ad elettroforesi su gel di agarosio allo 0.8% nel quale viene aggiunto Bromuro di Etidio, che ha la capacità di intercalarsi nella molecola di DNA e di renderla fluorescente se illuminata con UV (320 nm).

La preparazione dell'agarosio e la corsa elettroforetica sono state effettuate in tampone TAE 1X (0.8 M Tris-acetato e 0.02 M EDTA). La quantificazione del DNA si è eseguita confrontando l'intensità della fluorescenza di un volume noto dei campioni (in genere 2 µl) con quello di un marcatore a concentrazione nota, il DNA di batteriofago λ (in genere 100 ng). Questo metodo permette una stima visiva, ma sufficientemente precisa, della quantità di DNA caricato.

2.3 Protocollo AFLP

La tecnologia AFLP che prevede una prima fase, la preparazione del templato, in cui avviene la digestione con due enzimi di restrizione e la ligazione di adattatori specifici, e di una seconda fase (reazione AFLP) che consiste in due amplificazioni selettive dei frammenti precedentemente digeriti (figura 2.4). La tecnica descritta da Vos *et al.* prevede l'utilizzo di due enzimi: *EcoRI*, che riconosce una sequenza di sei nucleotidi [5'-GAATTC-3'] presente in media una volta ogni 4096 paia di basi e *MseI* [5'-TTAA-3'] presente in media ogni 256. Nelle specie animali l'eccessivo numero di siti riconosciuti dall'enzima

MseI e la conseguente difficoltà nella lettura dei profili, hanno portato alla sostituzione dell'enzima *MseI* con *TaqI* che riconosce una sequenza contenente tutti e quattro i nucleotidi [5'-TCGA-3'] (Vos & Kuiper, 1996). I marcatori AFLP *EcoRI/TaqI* sono stati prodotti seguendo il protocollo descritto in Ajmone Marsan *et al.* (1997).

2.3.1 Preparazione del templat

La prima digestione si effettua incubando per 1h a 65°C da 200 a 400 ng di DNA con una miscela composta da 5U *TaqI*, 10 mM Tris-Acetato pH 7.5, 10 mM Acetato di Magnesio, 50 mM Acetato di Potassio, 5 mM DTT (Ditiotreitolo), 50 ng/ml BSA (Albumina serica di bovino), in un volume finale di 25 µl.

Successivamente, 15µl di una miscela avente la composizione in sali, DTT e BSA già descritta, ma contenente 5U di *EcoRI* viene aggiunta alla prima ed incubata per 1 h a 37 °C.

Al termine della reazione gli adattatori sintetici (Tabella 2.2), disegnati in funzione degli enzimi utilizzati, vengono legati alle estremità dei frammenti di restrizione (fase di *ligation*) grazie all'enzima T4 ligasi. Gli adattatori sono disegnati in modo tale da non ricostruire in modo esatto le sequenze dei siti di restrizione e quindi, una volta legati ai frammenti, non possono più essere tagliati dagli enzimi, che sono ancora attivi alla fine delle digestioni. Vengono quindi aggiunti ai campioni 10 µl di una miscela composta da 5 pMol *EcoRI* adapters, 50 pMol *TaqI* adapters, 1 U DNA ligasi, 1 mM ATP, 5 mM DTT, 50 ng/ml BSA e si pone in incubazione a 37°C per 3h.

Poiché l'enzima *TaqI* (sito di 4 nucleotidi) taglia più frequentemente di *EcoRI* (sito di 6 nucleotidi), producendo molti più frammenti di dimensione inferiori a 300 paia di basi, è necessaria una diversa quantità dei due adattori

nella miscela di reazione. Si utilizzano infatti 50pmoli di adattatore TaqI e 5pmoli di adattatore EcoRI in ogni reazione.

I prodotti ottenuti dalla reazione di ligazione sono diluiti 1:10 (v/v) in TE 0,1X (10mM Tris, 0,1mM EDTA pH8).

2.3.2 Reazione AFLP: preamplificazione

La tecnica AFLP consiste in due passaggi di amplificazione e prevede, prima della reazione AFLP vera e propria, una pre-amplificazione allo scopo di iniziare una prima selezione ed aumentare la quantità di alcuni dei frammenti prodotti dalla digestione.

Il primo passaggio di amplificazione selettiva avviene utilizzando *primer* non marcati e con un'unica base selettiva, aggiunta al 3' di entrambi gli oligonucleotidi complementari agli adattatori Eco e Taq (i *primer* usati per la pre-amplificazione sono rispettivamente indicati dalle sigle E01 e T01, tabella 2).

La reazione di pre-amplificazione viene condotta in un volume totale di 20 μ l, contenente 5 μ l di DNA stampo diluito 1:10 e 15 μ l di miscela di reazione costituita da: 10mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM di ognuno dei quattro dNTPs, 1U AmpliTaq polimerasi, 75 ng di *primer* TaqI e 75 ng di *primer* EcoRI, entrambi con un nucleotide selettivo. La reazione di pre-amplificazione consiste nel seguente programma PCR:

30'' a 94°C denaturazione del DNA

1' a 56°C appaiamento dei *primer*

1' a 72°C reazione della polimerasi

}

30 CICLI

un passaggio finale di 10' a 72°C permette il completamento della reazione, che viene bloccata portando la miscela a 4°C.

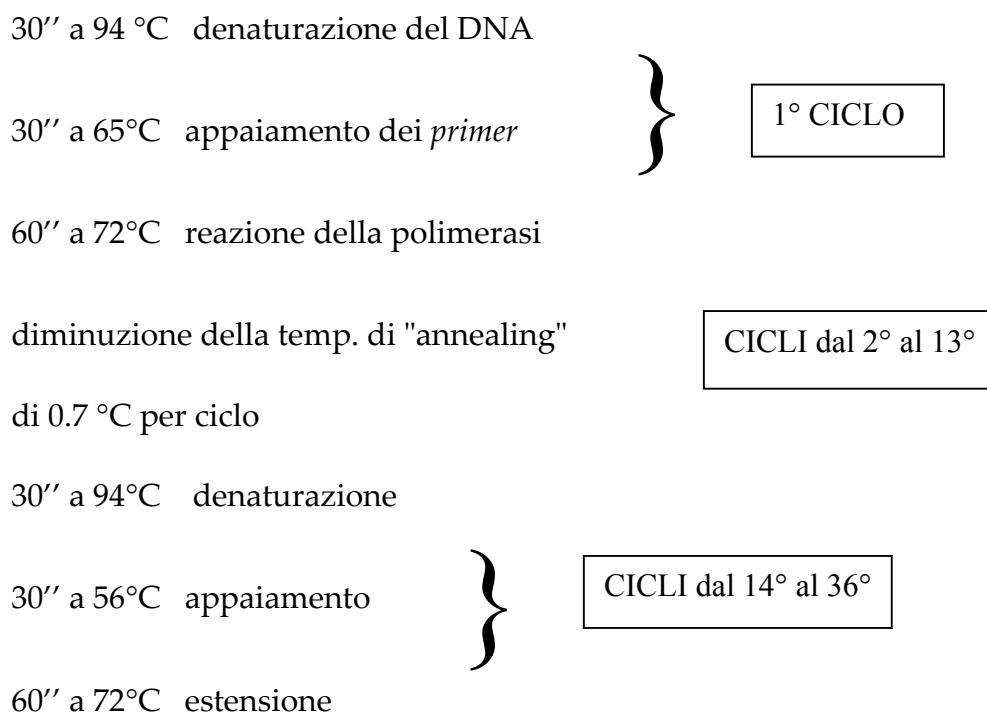
Il prodotto di preamplificazione viene diluito 1:20 (v/v) in TE 0,1X.

2.3.3 Marcatura del primer

La marcatura con l'isotopo radioattivo ^{33}P del *primer* selettivo EcoRI precede la reazione di amplificazione vera e propria. La reazione di marcatura del *primer* avviene secondo il modello *exchange reaction*, che consiste nel trasferimento del ^{33}P al terminale 5' del *primer*, mediante l'enzima T4 polinucleotide chinasi. Tale enzima è in grado di legare al *primer* defosforilato l'isotopo ^{33}P fornito da una molecola di ATP che porta tale isotopo in posizione γ ($\gamma^{33}\text{P}$ -ATP). A 10 μl di *primer* (50ng/ μl) viene aggiunta una miscela contenente 10 μl di $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), 5 μl di tampone T4 10X (250 mM Tris HCl pH 7.5, 100mM MgCl_2 , 50 mM DTT, 5 mM spermidine 3HCl-form), 1 μl di T4-Chinasi, 24 μl di H_2O . La reazione procede incubando la miscela ad una temperatura di 37°C per 60', cui seguono 10' a 70 °C per inattivare la Chinasi.

2.3.4 Reazione AFLP: amplificazione selettiva

Cinque microlitri del preamplificato diluito 1:20 vengono uniti ad una miscela costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5mM MgCl_2 , 0.2 mM di ognuno dei quattro dNTPs, 0.4U AmpliTaq polimerasi, 5ng di primer EcoRI marcato con ^{33}P e selettivo per 3 nucleotidi e 30 ng di *primer* TaqI non marcato con tre nucleotidi selettivi. La miscela di reazione viene amplificata con PCR secondo il profilo:



La reazione di amplificazione selettiva avviene utilizzando un programma di PCR *touch down*, partendo da una temperatura di appaiamento di, 65°C, superiore alla temperatura di denaturazione dei primer. Nei passaggi successivi questa temperatura viene progressivamente ridotta fino a portare la temperatura di *annealing* a 56 °C per il completamento della reazione. La PCR *touch down* favorisce l'amplificazione di sequenze perfettamente complementari agli inneschi utilizzati rispetto a frammenti non specifici.

2.3.5 Corsa elettroforetica e rilevazione

I prodotti di amplificazione AFLP vengono analizzati su gel denaturante di poliacrilammide al 4.5%. Per la preparazione del gel si utilizza una soluzione di acrilammide al 4.5% (20:1 acrilamide/bisacrilamide) che contiene 7.5 M urea

ultrapura, in TBE 5X (54g/l Tris borato, 25.5g/l Acido borico, 10 mM EDTA pH 8.0).

A una opportuna quantità della soluzione (che dipende dalla grandezza del gel, nel nostro caso 80 ml), preventivamente degassata con pompa a vuoto, si aggiungono, quali agenti polimerizzanti, 80 µl di TEMED e 420 µl di Persolfato di Ammonio (APS) al 10%. (A temperatura ambiente la polimerizzazione avviene in circa 30-45').

I prodotti di amplificazione, prima di essere caricati su gel, vengono miscelati con un pari volume di tampone di caricamento, costituito da amide formica al 98%, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.25% blu di bromofenolo e 0.25% xilene cianolo. I campioni vengono scaldati a 90 °C per 3' per denaturare il DNA e poi mantenuti in ghiaccio durante il caricamento del gel.

Viene effettuata una pre-corsa del gel in tampone TBE 0,5X fino a quando ha raggiunto una temperatura di 45°C circa (almeno 30 min.). Finita questa fase si caricano 3 µl di campione denaturati e si procede all'elettroforesi a 56 watt costanti per due ore. Alla fine dell'elettroforesi il gel viene trasferito su un foglio di carta Whatman ed asciugato con un apparecchio *gel dryer* per due ore ad una temperatura di circa 80 °C. Infine una lastra autoradiografica viene messa a contatto con il gel asciutto e lasciata esposta ai segnali radioattivi.

La durata dell'esposizione varia dalle 48 alle 100 ore in funzione della intensità di emissione del segnale radioattivo.

Nome oligonucleotide		Sequenza (5'→3')
Adattatori Taq	Taq top	GACGATGAGTCCTGAC
	Taq bottom	CGGTCAGGACTCAT
Adattatori Eco	Eco top	CTCGTAGACTGCGTACC
	Eco bottom	AATTGGTACGCAGTCTAC
E01		GACTGCGTACCAATTCA
T01		GATGAGTCCTGACCGAA

Tabella 2.2: sequenze degli adattatori che si legano ai frammenti digeriti e dei primer Eco e Taq (E01 e T01) utilizzati per la reazione di preamplificazione.

2.4 Scelta delle combinazioni di primer AFLP

Per la scelta delle combinazioni di primer in grado di rivelare il maggior numero di polimorfismi sono state testate su 6 capre appartenenti a diverse razze un totale di 64 coppie di primer (figura 2.3). Le *primer combinations* che hanno prodotto un profilo elettroforetico con maggior numero di polimorfismi di buona qualità sono state selezionate. In totale sono state scelte 3 combinazioni di primer (descritte nella tabella 2.4) in grado di amplificare oltre 100 polimorfismi AFLP

<i>Primer combination</i>	primer Eco AFLP (5'→3')	Primer Taq AFLP(5'→3')
E32/T38	GACTGCGTACCAATT CAAC	GATGAGTCCTGACCGA ACT
E43/T33	GACTGCGTACCAATTC ATA	GATGAGTCCTGACCGAA AG
E45/T32	GACTGCGTACCAATTC ATG	GATGAGTCCTGACCGAA AC

Tabella 2.4: combinazioni di primer scelte per la reazione AFLP (codici e sequenza intera del primer, con in grassetto i nucleotidi selettivi).

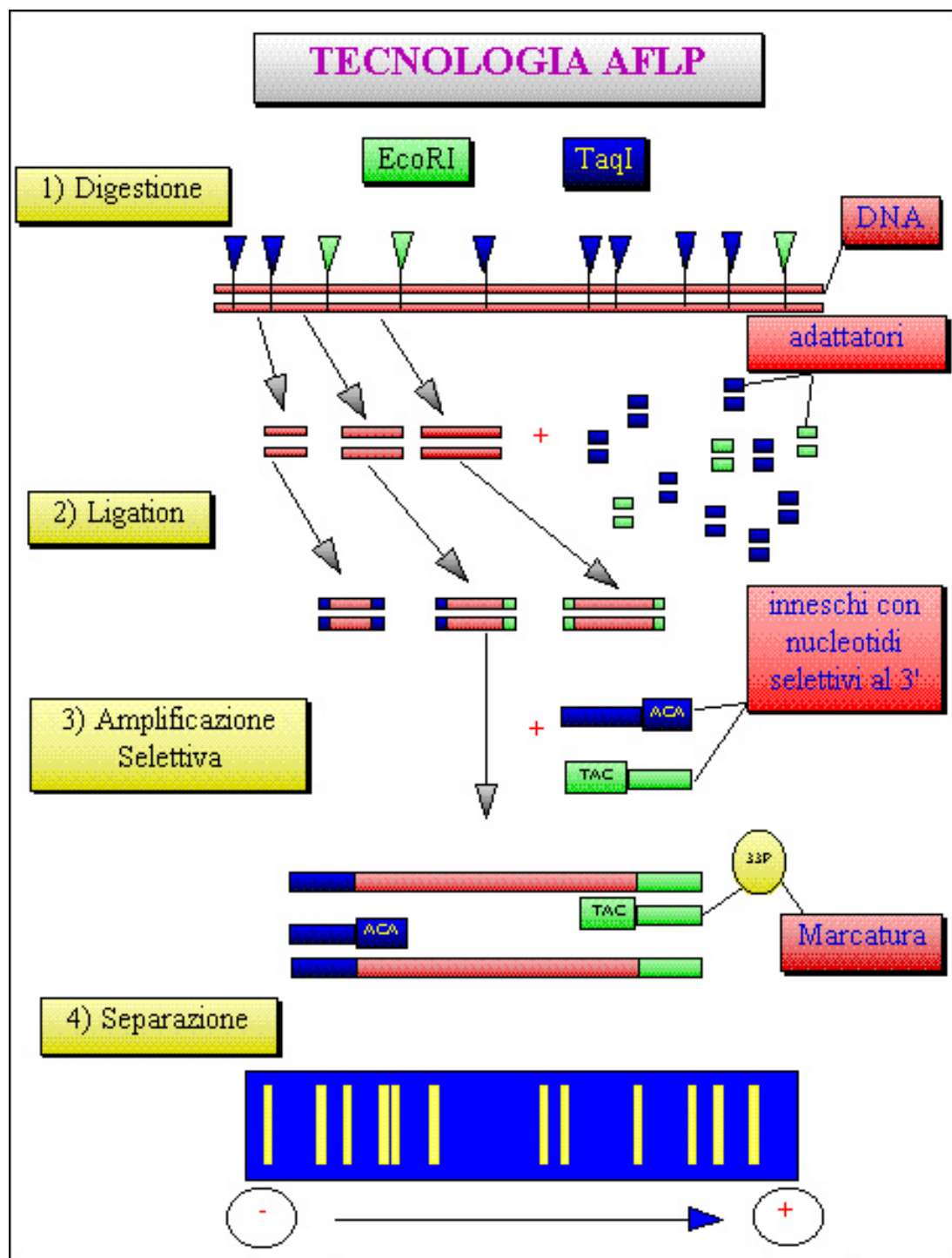


Figura 2.3: Rappresentazione grafica dei passaggi della tecnologia AFLP.

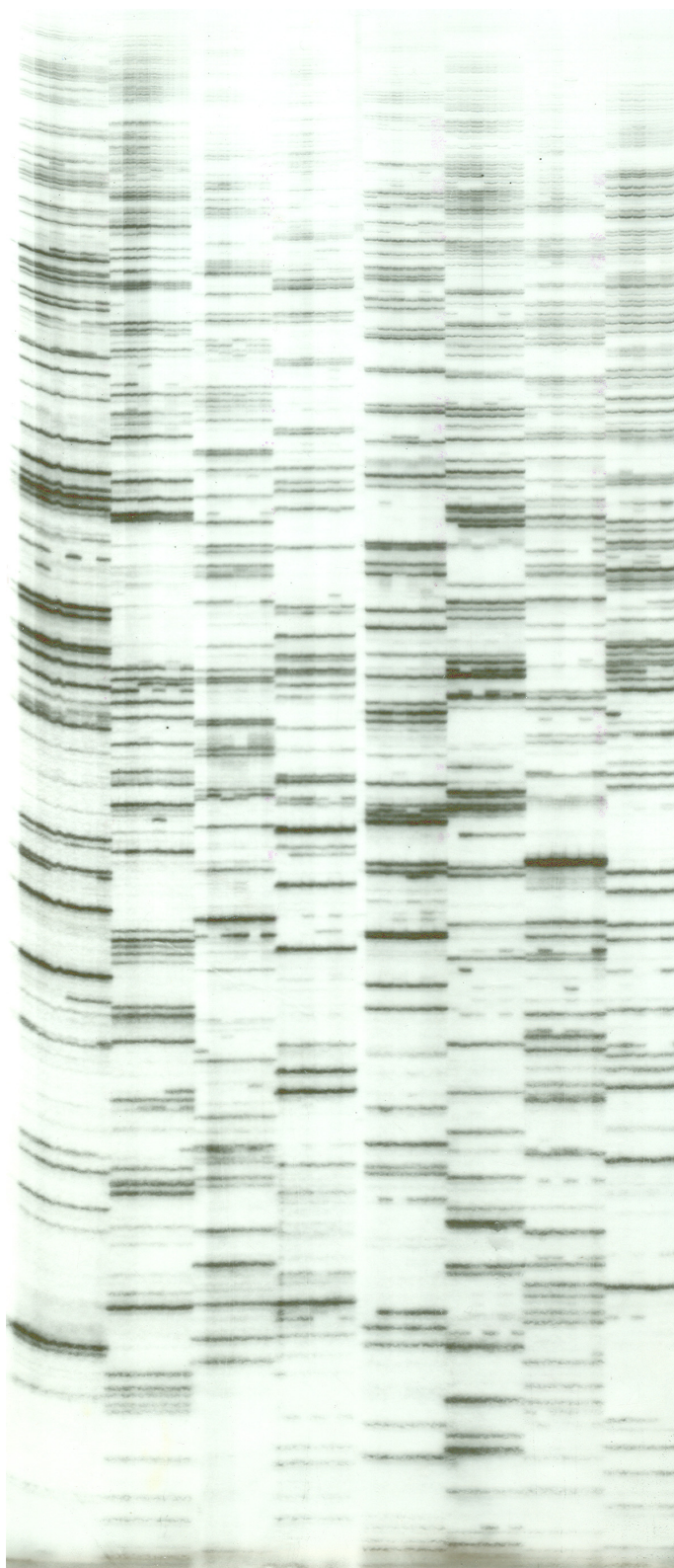


Figura 2.4: combinazioni di primer E32/T32, E32/T33, E32/T35, E32/T38, E33/T32, E33/T33, E33/T35, E33/T38 testati su 6 campioni di capre.

2.5 Metodi di analisi statistica

Per inferire la struttura genetica di una popolazione utilizzando marcatori AFLP dominanti (Holsinger, 2002) si assume che a ogni banda corrisponda un locus biallelico. E' necessario assumere che i loci analizzati con marcatori AFLP siano in equilibrio di Hardy-Weinberg e che ogni banda polimorfica rappresenti una delle due varianti alleliche (presenza di banda/assenza di banda) a un singolo locus.

La lettura dei dati è stata effettuata in modo binario: 0=banda assente, 1=banda presente, (2=dato mancante). Le letture sono state condotte in un range di frammenti di lunghezza variabile tra 50 a 500 bp; sono state considerate solo bande polimorfiche chiare e leggibili, mentre le bande deboli o non univocamente identificabili sono state scartate.

2.5.1 Summary statistic

Per l'analisi dei dati AFLP è stata scelta una combinazione di statistiche che permettesse di analizzare la diversità genetica a livello degli individui e delle razze. La matrice binaria dei marcatori AFLP letti in modo dominante è stata analizzata per le seguenti variabili:

- Stima delle frequenze alleliche (Liu B.H., 1997) e del numero di loci polimorfici (Vekemans X., 2002)
- Eterozigosità attesa media (Het) calcolata assumendo i loci in equilibrio di H-W (Nei M., 1987)
- Similarità genetica tra individui, indice di Jaccard (1908)

- Distribuzione della variabilità entro-tra popolazione con G_{st} (Nei M., 1987) e θ (Weir & Cockerham, 1984)
- Distanza di Reynolds tra razze (Reynolds *et al.*, 1983)
- Analisi delle Componenti Principali PCA (Nei M. & Kumar, 2000)
- Interpolazione su mappa geografica di dati genetici (Kriging)

A livello individuale (1304 animali) è stata calcolata la similarità tra individui all'interno di ogni razza (Jaccard). A livello di razza (47 razze) sono state analizzate la diversità entro (numero e % di loci polimorfici, Het attesa media, frequenza del genotipo recessivo), la distanza genetica tra coppie di razze (Reynolds) e la matrice delle distanze di Reynolds è stata visualizzata graficamente utilizzando l'analisi multivariata delle componenti principali.

2.5.2 Stima delle frequenze alleliche e numero di loci polimorfici

La diversità entro razza è stimata in base al numero di loci polimorfici totali e in base al calcolo dell'eterozigosi attesa.

Generalmente le frequenze osservate dei due alleli ($p_{(i)}$ e $q_{(i)}$) ad ogni locus stimate ipotizzando la popolazione in equilibrio di Hardy- Weinberg è dato dalla radice quadrata della frequenza del genotipo recessivo. Sapendo che la somma delle frequenze geniche è uguale a 1, la frequenza dell'allele presenza di banda $p_{(i)}$ è data da $1-q_{(i)}$.

In questo lavoro le frequenze alleliche sono state calcolate con un approccio Bayesiano, utilizzando il programma AFLP-surv 1.0 (Vekemans X., 2002). Con questo metodo la frequenza dell'allele recessivo assenza di banda di ciascun locus viene calcolata in base a due parametri: la grandezza del campione e il numero degli individui che non possiedono la banda AFLP.

L'approccio di Bayes permette di stimare con diversi algoritmi le frequenze alleliche ed è in grado di fornire stime più corrette specialmente degli alleli meno frequenti.

2.5.3 Eterozigosi attesa

Considerando una popolazione con accoppiamento casuale e assumendo che i marcatori AFLP in equilibrio di Hardy-Weinberg, l'eterozigosi è definita come la probabilità che un individuo scelto a caso dalla popolazione sia eterozigote a un locus.

L'eterozigosi attesa (Het_{exp}) in una popolazione dove avvengono accoppiamenti casuali è calcolata in base alle seguenti formule (Nei M., 1987):

$$Het_{exp(l)} = 1 - \sum_{i=1}^k p_{li}^2 = 2 \sum_{i=2}^k \sum_{j=1}^{i-1} p_{li} q_{lj}$$

Dove $p_{(li)}$ è la frequenza dell'allele i al locus l , $q_{(li)}$ la frequenza dell'allele recessivo rappresentato dall'assenza della banda e $k_{(l)}$ è il numero totale di alleli al locus l .

Per ogni razza è stata calcolata l'eterozigosi attesa media come media dei valori di eterozigosi attesa di tutti i loci.

2.5.4 Similarità genetica di Jaccard

La similarità genetica, stimata mediante l'indice di Jaccard (1908) misura la proporzione di bande in comune tra individui:

$$Jacc(i,j) = 2N(i,j)/(N(i)+N(j)- N(ij))$$

dove $Jacc(i,j)$ è la misura della similarità tra due individui i e j , $N(i,j)$ è il numero di bande in comune per gli individui i e j , $N(i)$ e $N(j)$ il numero totale di bande negli individui i e j rispettivamente.

2.5.5 Distanze genetiche

Le distanze genetiche sono un metodo per misurare la diversità tra le popolazioni e le matrici prodotte sono usate per la costruzione di alberi filogenetici o per la costruzione di grafici bidimensionali mediante analisi multivariata. Le distanze genetiche utilizzate per lo studio degli animali allevati (Nagamine & Higuchi, 2001) sono: di Roger, di Nei (minima distanza genetica, distanza genetica standard e DA), di Cavalli-Sforza (1966) e di Reynolds.

La distanza di Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983) si basa su un modello “*pure drift*” e considera la deriva come il fattore preponderante di differenziazione tra popolazioni escludendo tutte le altre forze evolutive. Questa distanza, che non considera le mutazioni, è spesso utilizzata per stimare la distanza tra animali zootecnici, considerando che la domesticazione è un evento recente (10000 anni fa) in termini evolutivi. Le popolazioni ideali a cui può essere applicato sono *non-inbred*, essenzialmente infinite, in equilibrio di H-W a ciascun locus e in *linkage equilibrium* a ogni coppia di loci. Assumendo che ci siano m alleli che segregano a un locus di un marcatore, dato $i=1,\dots,m$, $p_{i,A}$ la frequenza dell'allele i -esimo a quel locus nella popolazione A e $p_{i,B}$ la frequenza dell' i -esimo allele a quel locus nella popolazione B, la distanza tra la popolazione A e B è data dalla seguente formula:

$$\theta_{locus} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (p_{i,A} - p_{i,B})^2}{2 \times \left(1 - \sum_{i=1}^m p_{i,A} \times p_{i,B}\right)}}$$

La distanza genetica di Reynolds è una misura utile per lo studio di popolazioni relativamente correlate o che si sono differenziate in tempi recenti, come le razze delle specie animali di allevamento..

2.5.6 G_{ST} e θ

La suddivisione della variabilità genetica nelle sue componenti di varianza tra popolazioni ed entro popolazioni (struttura delle popolazioni) può essere misurata con la statistica di Wright (F_{ST} ; Wright, 1951), con G_{ST} (Nei M., 1973) e G_{ST-B} (Nei, 1987) o con θ di Weir & Cockerham (1984). La differenziazione delle popolazioni è stata calcolata utilizzando un analogo del coefficiente di differenziazione di Nei (1973), l'indice $G_{ST} unbiased$ calcolato con il programma Genetix (Belkhir *et al.*, 2004) e controllata con θ , che stima un $F_{ST} unbiased$ (corregge gli errori di causati da campionamento non omogeneo).

Nei (1973) propose un approccio alternativo all' F_{ST} di Wright per determinare la differenziazione delle popolazioni, che si basa sulle frequenze alleliche da cui si deriva l'eterozigosi attesa entro e tra popolazioni.

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

Dove: H_T è la diversità genica nella popolazione totale, dato da $(H_S + D_{ST})$ e D_{ST} è la media delle diversità geniche tra sottopopolazioni ($D_{ST} = J_S + J_T$).

La formula riguardante la stima *unbiased* di F_{IS} (θ) è:

$$F_{st}(\theta) = \frac{\sum_i (A_i)}{\sum_i (A_i + B_i + C_i)}$$

Dove A_i è la componente della varianza delle frequenze alleliche all'interno delle popolazioni, B_i è la componente tra individui (all'interno di ciascuna popolazione e C_i la componente tra gameti a livello di ciascun individuo).

2.5.7 Dendrogrammi: metodo Neighbor Joining

Le matrici di distanza genetica possono essere rappresentate tramite dendrogrammi ad albero. Il metodo di *clustering* utilizzato è l'algoritmo Neighbor-Joining (NJ - Saitou and Nei, 1987). I dati grezzi della matrice di distanza producono un albero iniziale a stella, da cui viene costruita una matrice modificata basandosi sulla coppia di OTU con minore distanza (*neighbors*). L'interazione del processo di *clustering* viene effettuata fino a quando non sono stati determinati gli $n-3$ rami interni dell'albero. Il dendrogramma è stato elaborato utilizzando il programma PHYLIP (Felsenstein, 1989).

2.5.8 Analisi multivariata

Date n popolazioni, sono richieste $n-1$ dimensioni per rappresentare graficamente le distanze genetiche tra loro. L'analisi multivariata permette di rappresentare questo spazio multidimensionale in due o tre dimensioni mantenendo la massima quantità di informazione (in termini di varianza spiegata) ed al contempo rendendo il fenomeno più comprensibile riducendone la complessità. Ai dati in esame è stata applicata l'analisi delle componenti principali (PCA). Per la PCA vengono costruite combinazioni lineari, dette

componenti principali, delle variabili originali (nello specifico le distanze genetiche di Reynolds) che caratterizzano le OTU. Le variabili trasformate vengono costruite in modo che risultino indipendenti tra loro e vengono classificate in funzione della loro varianza (la prima componente principale rappresenta la variabile con varianza maggiore, il secondo la variabile con maggior varianza, esclusa la prima. etc.). Le OTU vengono poi rappresentate su questi assi principali ortogonali tra loro. N variabili originali vengono così trasformate in N componenti principali, ma in caso di dipendenza tra le variabili originali, le prime due o tre componenti sono in grado di rappresentare molto meglio il fenomeno studiato di qualsiasi coppia o tripletta di variabili originali. Le coordinate delle componenti principali possono essere trasferite su una mappa geografica per mettere in evidenza componenti geografiche della variabilità tra razze. Il software utilizzato per l'analisi PCA è stato STATISTICA ver. 7.0.

La *factorial correspondence analysis* (FCA) è un'analisi multivariata che rappresenta graficamente i genotipi multilocus basandosi sulla differenza tra le distribuzioni osservate dei genotipi con quelle attese se gli alleli fossero assegnati a caso agli individui. A differenza della PCA, che lavora su una matrice di distanze (nel nostro caso quella di Reynolds) la FCA crea una nuova matrice di dati a partire da quella binaria AFLP. Come nella PCA gli assi che rappresentano le componenti della variabilità sono indipendenti e sono frazioni dell'informazione misurata con un parametro detto inerzia o dispersione. La rappresentazione grafica degli individui o delle razze è data da una nuvola di punti dispersa nello spazio metrico; la direzione della massima inerzia è la direzione in cui la distribuzione dei dati è maggiormente allargata. Nel presente lavoro l'analisi fattoriale delle corrispondenze è stata effettuata grazie al programma Genetix (Belkhir *et al.*, 2004) e all'opzione "AFC sur populations"

2.6 Rappresentazione dei dati genetici su quelli geografici

2.6.1 Database dei Centroidi

Un centroide rappresenta il centro di un rettangolo ipotetico che racchiude tutti gli allevamenti in cui è stata campionata una determinata razza. I centroidi sono stati utilizzati per calcolare le distanze geografiche tra le razze e costruire una matrice di distanza (unità=km). Il database dei centroidi contiene quindi le coordinate geografiche dei centroidi di 42 su 47 popolazioni di capre. Nella figura 2.5 sono visibili gli allevamenti analizzati nel progetto ECONOGENE (quelli rossi/scuri si riferiscono alle razze di capre, quelli gialli/chiaro alle pecore).

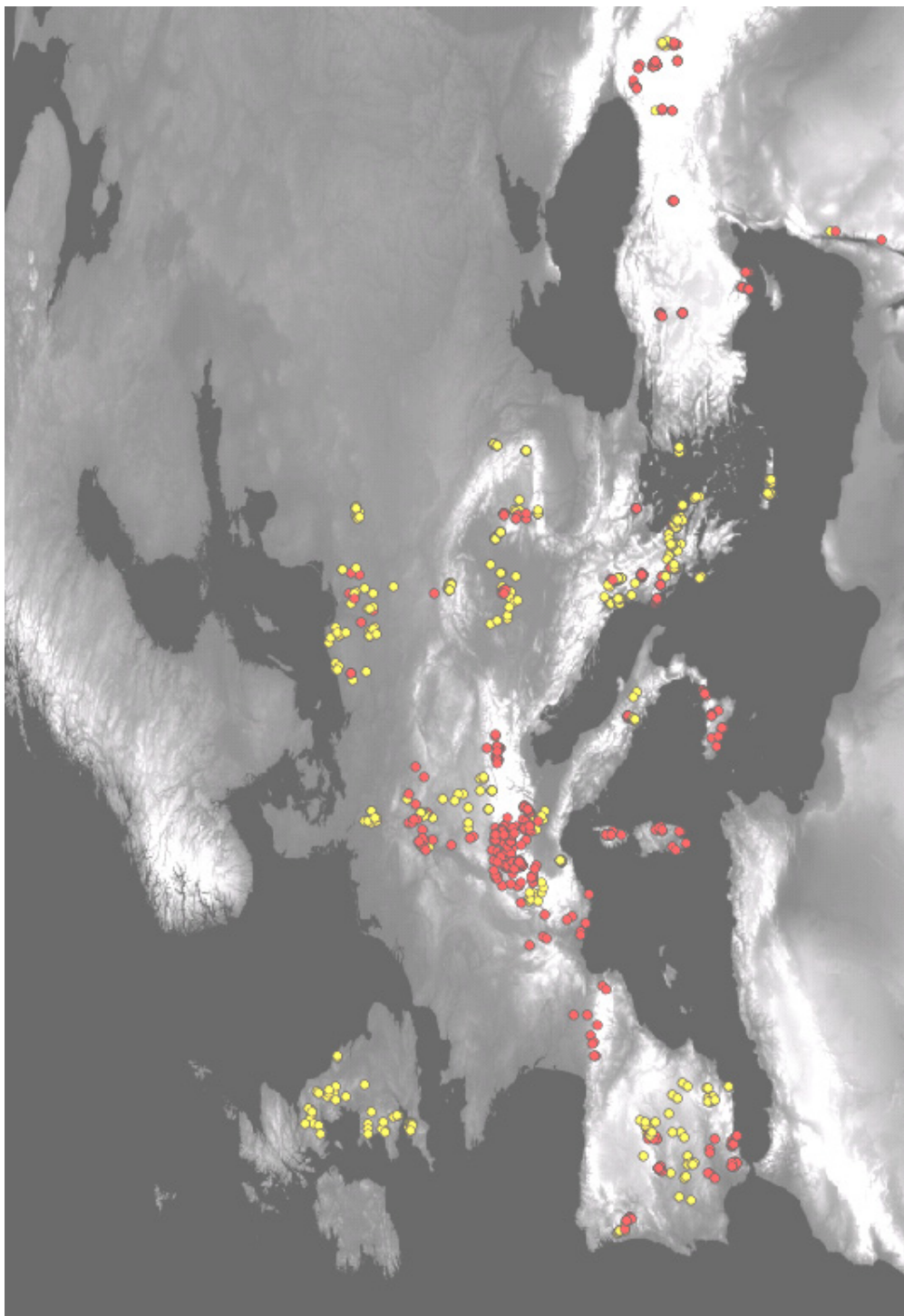


Figura 2.5: localizzazione geografica degli 885 siti di campionamento di capre (pallini rossi) e pecore (pallini gialli)

2.6.2 Interpolazione

Le coordinate delle diverse popolazioni relative alle prime due componenti principali sono state rappresentate sulle mappe geografiche utilizzando come riferimento la localizzazione geografica del centroide per ogni razza. I valori sono poi stati interpolati (metodo Kriging) per migliorare l'impatto visivo delle distribuzioni spaziali dei parametri genetici in riferimento alle razze. La tecnica Kriging usa una combinazione lineare di pesi ai punti conosciuti per stimare il valore dei punti nella griglia da cui è formata la mappa geografica. Sfrutta il cosiddetto *variogramma* che è una rappresentazione delle differenze spaziali e dei dati genetici tra tutte le possibili coppie di punti nel data set. Il variogramma quindi descrive i fattori pesati che saranno applicati per l'interpolazione.

Questa tecnica di rappresentazione permette di distinguere meglio le variazioni dei valori dei parametri genetici a livello geografico utilizzando delle sfumature di colore (da colori freddi come il blu a colori caldi come il rosso). L'interpolazione può però "fuorviare" nella lettura quando la distanza tra i centroidi è molto elevata, quindi la visualizzazione più "veritiera" dell'andamento dei dati è quella data dai pallini di diversa tonalità di colore a livello dei centroidi. Inoltre l'interpolazione in questo caso non ha valore predittivo, ma facilita solo la visualizzazione di pattern geografici.

3. Risultati e Discussione

3.1 Variabilità genetica e marcatori neutri

L'oggetto di questo lavoro di tesi è stato quello di analizzare la variabilità genetica delle razze del Centro-Est Europa e del bacino del Mediterraneo appartenenti alla specie *Capra hircus* tramite marcatori neutri AFLP. Le razze di capra sono state campionate in un ampio territorio che comprende 2 continenti (Asia, Europa) e include il centro di domesticazione (vicino Oriente). Gli animali campionati appartengono a razze autoctone allevate in aree agricole marginali. Il campionamento è avvenuto in 885 allevamenti (447 di capre, figura 3.1). In totale sono stati campionati 1504 individui di *C. hircus* appartenenti a 47 diverse razze (tabella 2.1 nei materiali e metodi).

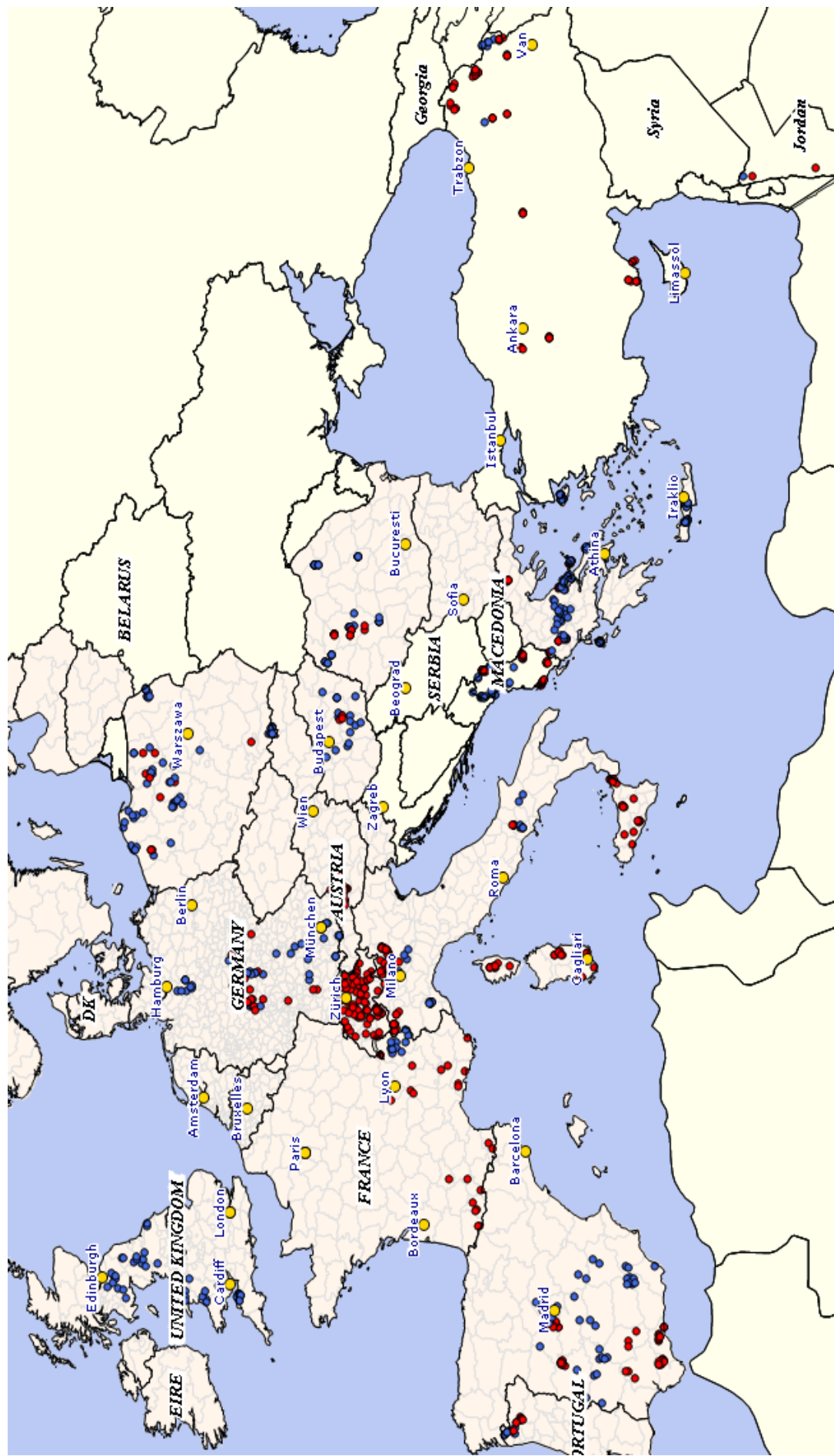


Figura 3.1: distribuzione geografica delle aziende coinvolte nel campionamento del razze caprine (in rosso) e ovine (in blu).

La variabilità genetica è stata studiata utilizzando come strumenti molecolari i marcatori AFLP che consentono un'analisi *multilocus* del DNA e producono un elevato numero di polimorfismi per esperimento. Questa tecnica identifica le differenze esistenti tra individui e popolazioni a livello di loci neutri. Tali differenze sono imputabili a mutazioni avvenute prima del processo di domesticazione e mantenute fino ad oggi. I marcatori neutri sono generalmente considerati utili per stimare la diversità genetica esistente tra popolazioni anche per caratteri importanti, quali quelli adattativi e produttivi. Idealmente si vorrebbe che tutta la variabilità genetica rimanesse a disposizione delle future generazioni. Spesso le risorse a disposizione non sono sufficienti per conservare tutta la diversità genetica esistente in una specie. Scelte sulle priorità di conservazione devono essere fatte anche in assenza di conoscenze adeguate sui determinanti della variabilità genetica funzionale. Stime indirette possono essere ottenute dalla misura dei caratteri fenotipici. Questi rappresentano in modo approssimativo l'effetto medio delle varianti funzionali dei geni posseduti da un individuo o da una popolazione. Purtroppo i fenotipi della maggior parte dei caratteri non sono misurati in modo sistematico nelle popolazioni zootecniche. In mancanza di dati fenotipici affidabili e di dati sui geni responsabili, l'alternativa più rapida e a basso costo è la misura della diversità genetica attraverso i polimorfismi di marcatori anonimi. Lo studio a livello nucleotidico di loci neutri permette quindi di valutare la variabilità genetica presente in una popolazione anche quando non viene espressa in modo evidente a livello fenotipico. Attraverso i marcatori neutri è possibile evidenziare, tramite lo studio di parti non codificanti del genoma, la variabilità a molti loci e presupporre che questa misura rispecchi l'andamento della diversità a livello delle regioni codificanti. Il mantenimento della variabilità nucleotidica è necessario per mantenere inalterata la capacità del pool genico di

una popolazione di adattarsi a necessità future, e per evitare gli effetti deleteri dell'omozigosi sui caratteri produttivi e riproduttivi.

3.2 Tecnica AFLP

La tecnologia AFLP ha identificato in modo efficiente un numero elevato di marcatori polimorfici nei campioni di capra analizzati. Nei mammiferi, l'enzima *TaqI* permette di ottenere dei profili più chiari e polimorfici rispetto a *MseI*, utilizzato per produrre AFLP nei vegetali e sperimentato in topo (Otsen *et al.*, 1996). *TaqI* contiene nel sito di restrizione il dinucleotide CpG, che, nel genoma dei mammiferi, è altamente metilato (in più del 90% dei casi è la Citosina il nucleotide preferenziale della metilazione). La 5-metil citosina è facilmente soggetta a fenomeni di transizione in timina a seguito di deaminazione, quindi nei mammiferi la coppia di nucleotidi CpG muta frequentemente in TpG. L'uso di *TaqI*, che non è sensibile alla metilazione, permette di conseguenza l'identificazione di un numero di polimorfismi di restrizione stimato essere da due a quattro volte superiore rispetto a quello identificato da *MseI*. (Vos & Kuiper, 1996).

I polimorfismi AFLP identificano gli stessi tipi di mutazione rilevati dai marcatori RFLP (sostituzioni di basi, inserzioni, delezioni e riarrangiamenti). La tecnologia AFLP, se confrontata con quella RFLP, è in grado di identificare in modo estremamente preciso frammenti di lunghezza simile, grazie alla alta risoluzione dei gel di sequenza ed alla chiarezza del segnale originato dall'isotopo ³³P. E' quindi atteso che i marcatori AFLP siano in grado di stimare con accuratezza le similarità genetiche tra individui e popolazioni sia nelle

analisi entro specie sia tra specie vicine dal punto di vista evolutivo (Buntjer *et al.*, 1997).

3.2.1 Affidabilità

Gli AFLP sono prodotti attraverso una reazione PCR ad alta stringenza che assicura l'amplificazione di sequenze comprese tra due siti di attacco complementari ai primer e garantisce pertanto un'alta riproducibilità dei risultati.

La ripetibilità, testata confrontando i profili AFLP ottenuti da estrazioni indipendenti degli stessi individui, è risultata buona (oltre il 99%). Tale caratteristica distingue gli AFLP dai marcatori RAPD che spesso sono poco riproducibili. I RAPD infatti vengono amplificati in condizioni di bassa stringenza e sono molto sensibili a variazioni anche minime del protocollo sperimentale. In particolare sono influenzati dalla concentrazione salina della reazione, dai profili delle temperature usate durante la PCR, ma anche dal tipo di DNA polimerasi termostabile utilizzata e dal metodo scelto per la separazione e la lettura delle bande (Valentini *et al.*, 1997).

I marcatori AFLP si comportano come caratteri Mendeliani semplici, come verificato in diverse specie vegetali: orzo, (Becker *et al.*, 1995), patata (Meksem *et al.*, 1995; van Eck *et al.*, 1995) e mais (Ajmone-Marsan *et al.*, 1998). Nei mammiferi il comportamento Mendeliano di questi marcatori è stato osservato in topo (Otsen *et al.*, 1996) e bovino (Ajmone-Marsan *et al.*, 1997).

3.2.2 Polimorfismo

La valutazione preliminare di un numero elevato di coppie di primer su un numero limitato di genotipi è stata utile per la scelta delle combinazioni migliori. L'utilizzo di coppie di primer in grado di produrre dei profili elettroforetici chiari e altamente polimorfici ha permesso, infatti, di aumentare l'efficienza dell'analisi AFLP e di contenere i costi sperimentali.

Le analisi AFLP su 47 popolazioni di capre e 1504 animali hanno prodotto un dataset grezzo di 110 marcatori con le 3 combinazioni di primer considerate. Sono state eliminate le bande polimorfiche di cattiva qualità, con intensità variabile o difficilmente distinguibili da bande contigue. Eliminando i marcatori con più del 5% dei dati mancanti sono stati mantenuti nell'analisi 1304 individui e nel dataset finale 101 marcatori che costituiscono circa 132,000 dati di matrice binaria (i marcatori AFLP sono stati considerati dominanti) raggiungendo una bassa percentuale (7%) di dati mancanti. Le 3 combinazioni di primer *EcoRI/TaqI* scelte (E32/T38, E43/T33, E45/T32) hanno amplificato 279 frammenti di restrizione nell'intervallo 50-550 bp ed identificato 101 polimorfismi (36.2% del totale) con una media di 33.7 bande polimorfiche per combinazioni di primer (Tabella 3.1). Tale valore risulta superiore rispetto a quello riscontrato per le razze caprine dell'Italia settentrionale (16.5) come risultato dal lavoro di Ajmone-Marsan *et al.* (1998). Un valore doppio di media di bande polimorfiche è dovuto all'analisi di un numero molto maggiore di razze geograficamente e geneticamente differenziate, ed all'uso esclusivo delle tre combinazioni di primer più polimorfiche.

Combinazione di primer	E32/T38	E43/T33	E45/T32	Media	Totale
N° bande polimorfiche	24	35	42	33.7	101
% sul totale	23.76%	34.65%	41.58%	33%	100%

Tabella 3.1: Numero di bande polimorfiche per combinazione di primer.

Nelle figure 3.2, 3.3 e 3.4 sono visibili i profili elettroforetici relativi ai soggetti di razza Girgentana e Argentata. analizzati rispettivamente con le combinazioni E32/T38, E43/T33 e E45/T32. La combinazione di primer che ha permesso di ottenere il maggior numero di polimorfismi è la E45/T32 (Tabella 3.1).

Il numero di loci polimorfici nelle razze di capra analizzate (Tabella 3.2) varia da 49 (48.5%) nella Girgentana (Italia) a 74 (73.3%) nella Baladie (Giordania), considerando i polimorfismi che hanno una frequenza dell'allele presenza di banda nell'intervallo 0.05-0.95 (criterio del 95%). Il numero di loci polimorfici è omogeneo all'interno di alcuni paesi, mentre per altri ci sono razze con polimorfismi inferiori o superiori alla media. Polimorfismi superiori alla media (60.5) sono stati individuati in Albania, Spagna e Turchia; in Romania (solo 1 razza) e in Giordania (che ha il valore massimo). Sotto la media sono le razze campionate in Svizzera, Germania e Grecia. Valori variabili si hanno negli altri paesi, come in Austria (Tauernschecken ha un numero piccolo, mentre la Pinzgauer alto), in Francia e in Italia (dove la Girgentana ha il valore più basso, 49 e la Camosciata uno dei più alti, 64)

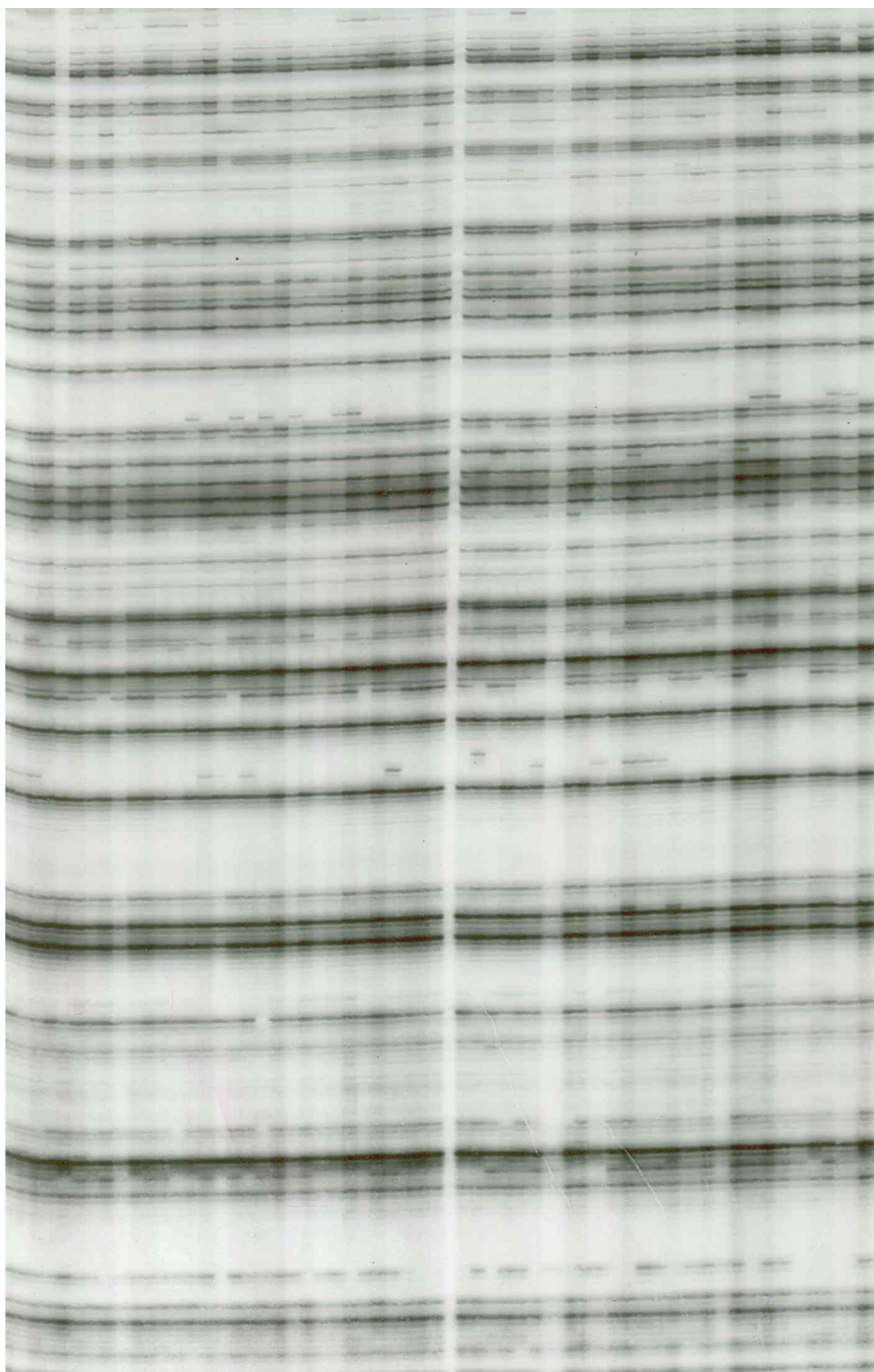


Figura 3.2: esempio di profilo AFLP delle razze Girgentana e Argentata con la combinazione di primer E32/T38

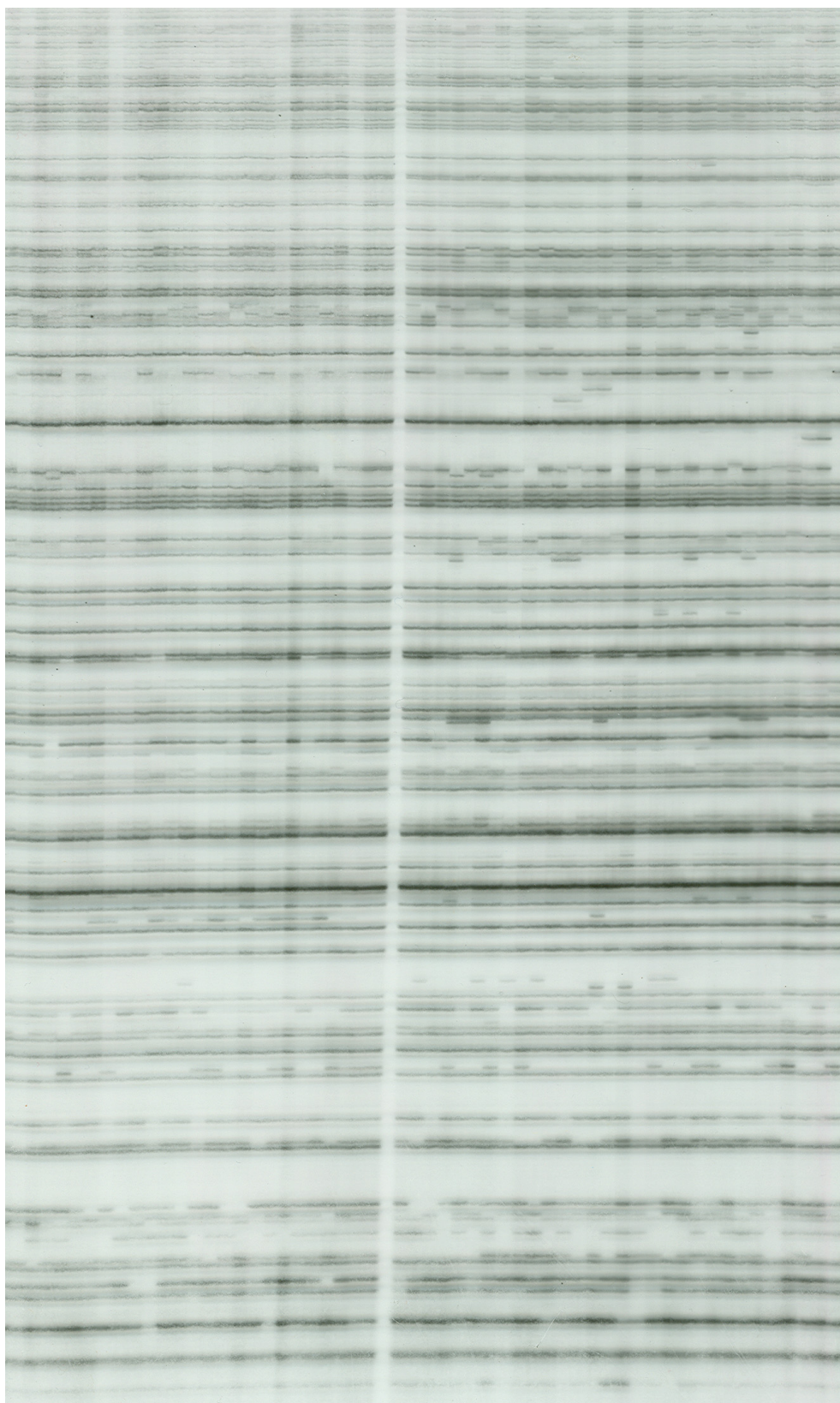


Figura 3.3: esempio di profilo AFLP delle razze Girgentana e Argentata con la combinazione di primer E43/T33

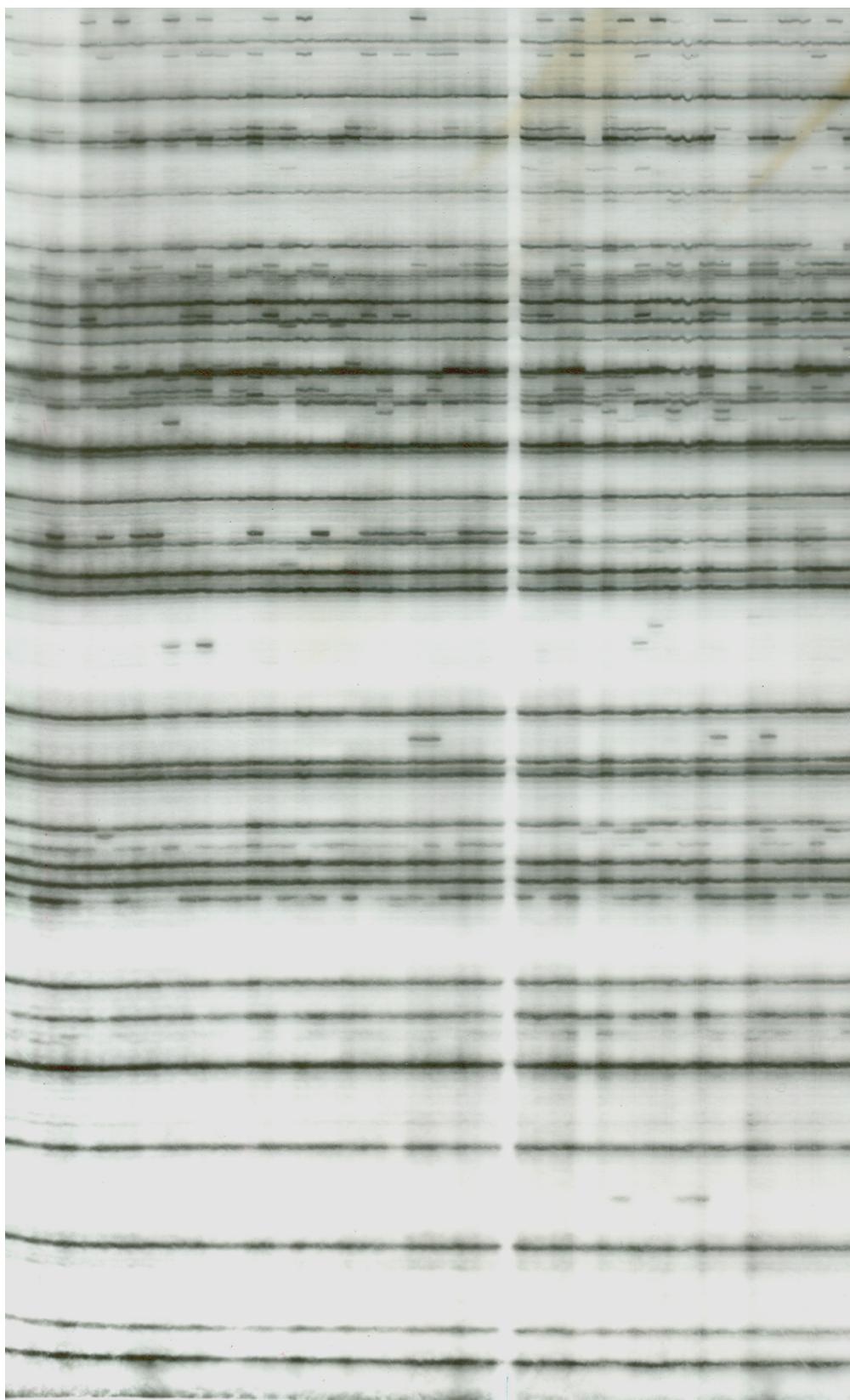


Figura 3.4: esempio di profilo AFLP delle razze Girgentana e Argentata con la combinazione di primer E45/T32

Codice	Paese	Razza	n	Loci polimorfici	% loci polimorfici
ChItGIR	Italia	Girgentana	30	49	48.5
ChAuTAS	Austria	Tauernschecken	29	52	51.5
ChFrPYR	Francia	Pyrenean	29	54	53.5
ChChVBN	Svizzera	Valais Black Neck	30	54	53.5
ChItORO	Italia	Orobica	29	55	54.5
ChItVAL	Italia	Valdostana	30	55	54.5
ChGrSKO	Grecia	Skopelos goat	30	55	54.5
ChItGMO	Italia	Grigia Molisana	30	56	55.4
ChChPCG	Svizzera	Peacockgoat	28	56	55.4
ChChSGB	Svizzera	St. Gallen booted Goat	28	56	55.4
ChDeTWZ	Germania	Thuringian forest goat	27	57	56.4
ChAILIQ	Albania	Liqenasi	29	57	56.4
ChFrROV	Francia	Rove	30	58	57.4
ChDeBDE	Germania	German Alpine goat	28	58	57.4
CHPIBUK	Polonia	Polish Fawn improved goat	28	58	57.4
ChChALP	Svizzera	Swiss Alpine	57	58	57.4
ChChGRS	Svizzera	Grisou striped	27	58	57.4
ChSpPYY	Spagna	Payoya	27	59	58.4
ChPoBRA	Portogallo	Brava	19	59	58.4
ChGrGRG	Grecia	Greek goat	29	59	58.4
ChSpVRT	Spagna	Verata	25	60	59.4
ChFrCOR	Francia	Corsican	27	60	59.4
ChSaNAG	Arabia Saudita	Najrani	29	60	59.4
ChAlHAS	Albania	Hasi	23	60	59.4
ChTkABA	Turchia	Abaza	24	61	60.4
ChFrALP	Francia	French Alpine	29	61	60.4
ChSpMLG	Spagna	Malagueña	26	61	60.4
ChSpFLR	Spagna	Florida	26	62	61.4
ChTkANG	Turchia	Angora	28	63	62.4
ChItARG	Italia	Argentata dell'Etna	30	63	62.4
ChItSAR	Italia	Sarda	29	63	62.4
ChAuPIZ	Austria	Pintzgauer	29	63	62.4
ChItCAM	Italia	Camosciata	28	64	63.4
ChItBIO	Italia	Bionda dell'Adamello	26	64	63.4
ChAIMUZ	Albania	Muzhake	25	64	63.4
ChAIDUK	Albania	Dukati	16	64	63.4
ChAICAP	Albania	Capore	29	65	64.4
ChAIMAT	Albania	Mati	26	65	64.4
ChSpGDR	Spagna	Guadarrama	28	66	65.3
ChTkGUR	Turchia	Gurcu	24	66	65.3
ChSaBES	Arabia Saudita	Beeshi	26	68	67.3
ChTkHAI	Turchia	Hair	28	69	68.3
ChRoCAR	Romania	Carpathian	22	69	68.3
ChJoBAL	Giordania	Baladie	18	74	73.3

Tabella 3.2: Numero di loci polimorfici e percentuale di loci polimorfici (percentuale di polimorfismi rispetto al totale dei marcatori polimorfici) delle razze analizzate.

Per valutare l'effetto del campionamento sull'analisi dei dati AFLP sono stati effettuati campionamenti in doppio nel paese di origine (Svizzera) ed in Francia della razza *Swiss Alpine*. Per verificare l'effetto di selezione e divergenza genetica di razze trasferite recentemente dalla loro regione di origine, il campionamento della razza *Swiss Alpine* è stato effettuato anche in Italia (Camosciata) e Germania (German Alpine).

L'albero Neighbor-Joining sulle matrici delle distanze di Reynolds (Figura 3.1) mette in evidenza una elevata similarità tra le diverse popolazioni di *Alpine*, che risultano raggruppate sullo stesso ramo. I due campionamenti della *Swiss Alpine* (ChCHALP e ChCHALP1) sono risultati estremamente simili, mentre una delle *Alpine* campionata in Francia (ChFrALP) si raggruppa prima con la Camosciata e solo successivamente con l'altra *French Alpine* ChFrALP1. La German Alpine risulta invece esclusa da questo cluster. Dai dati ottenuti sembra che gli effetti di campionamento siano trascurabili e che il livello di differenziamento delle popolazioni di *Alpine* campionate nei diversi paesi sia variabile, basso nel caso di Svizzera, Italia e Francia e notevole nel caso della Germania.

La razza *Swiss Alpine* allevata in Francia (ChFrALP) e in Svizzera (ChChALP) e la camosciata (ovvero l'*Alpine* italiana ChItCAM) si raggruppano nello stesso cluster insieme ad un'altra razza Svizzera, (ChChVBN, Valais Black Neck, tipica delle Alpi), una Francese (ChFrROV, Rove) originaria della Provenza e sorprendentemente una razza portoghese (ChPoBRA). La presenza di questa razza, nettamente distante geograficamente dalle altre che si trovano tutte nell'area Alpina, può far sospettare l'utilizzo della *Alpine* per il suo miglioramento genetico.

La stima delle frequenze alleliche di ogni marcatore per ciascuna popolazione è stata stimata secondo un approccio Bayesiano grazie al programma AFLP-surv 1.0 assumendo una distribuzione a priori uniforme. Le frequenze alleliche di ciascun marcatore sono state plottate sulla cartina geografica in cui sono rappresentate le coordinate dei centroidi di ciascuna zona di campionamento. per poter individuare particolari *trend*. Un esempio di gradiente geografico è quello riscontrato per un allele del marcatore (E45_T32_25). Nella figura 3.6 i centroide, rappresentati da pallini sulle zone di campionamento, sono colorati in base alla classe di frequenza dell'allele.

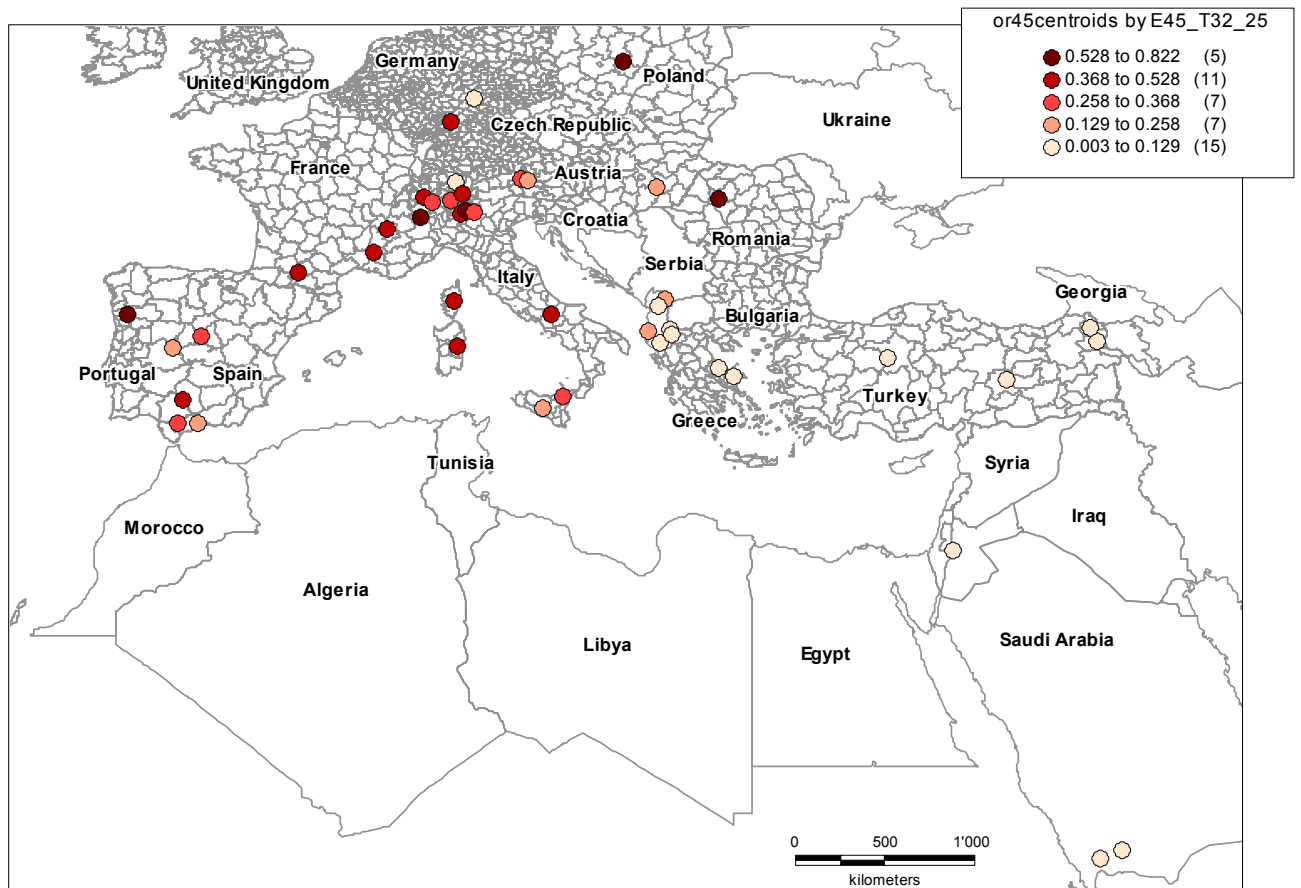


Figura 3.6: rappresentazione geografica in base alle frequenze alleliche dell'allele del marcatore E45/T32-25 che esibiscono un gradiente sud-est nord-ovest.

L'eterozigosi attesa è stata calcolata partendo dalle frequenze alleliche ottenute secondo un approccio Bayesiano. L'eterozigosi media attesa per locus, che rappresenta la diversità media presente nei loci analizzati appartenenti alle 47 razze e i rispettivi errori standard sono descritti nella tabella 3.3. L'eterozigosi attesa media varia da 0.17329 nella razza Valais Black Neck a 0.23136 nella razza Dukati. Le differenze non risultano significative in base al test t, eccetto che per le razze Valais Black Neck (Svizzera) e Angora (Turchia) che hanno un valore di eterozigosi attesa significativamente più basso della Dukati (Albania) e della Carpathian (Romania) ($p < 0.05$). Nella tabella 3.4 è indicata anche la razza Girgentana (Italia) che è al limite della significatività ($p = 0.577$) con la razza Dukati.

Osservando la figura 3.7 si può notare come esista una bassa correlazione tra eterozigosi e numero di polimorfismi (che non dipendono dalle frequenze alleliche ma solo dall'assenza della banda). E' stato calcolato un coefficiente di correlazione pari a 0.55 ($p > 0.9995$). Non si può inoltre identificare un gradiente di variazione dei valori di eterozigosi attesa e del numero dei polimorfismi.

Codice	Paese	Razza	n	H _{exp}	S.E.(H _{exp})	Significatività (p<0.05)
ChChVBN	Svizzera	Valais Black Neck	30	0.17329	0.01534	p=0.0145(DUK,CAR)
ChTkANG	Turchia	Angora	28	0.18253	0.01531	p=0.38 (DUK,CAR)
ChItGIR	Italia	Girgentana	30	0.18409	0.01727	p=0.577(DUK)
ChChALP	Svizzera	Swiss Alpine	57	0.18498	0.01650	ns
ChItVAL	Italia	Valdostana	30	0.18515	0.01660	ns
ChGrSKO	Grecia	Skopelos goat	30	0.18871	0.01673	ns
ChFrALP	Francia	French Alpine	29	0.18874	0.01586	ns
ChAuTAS	Austria	Tauernschecken	29	0.19005	0.01710	ns
ChFrROV	Francia	Rove	30	0.19155	0.01623	ns
CHPIBUK	Polonia	Polish Fawn improved goat	28	0.19174	0.01723	ns
ChSpFLR	Spagna	Florida	26	0.19305	0.01608	ns
ChChPCG	Svizzera	Peacockgoat	28	0.19312	0.01694	ns
ChAlCAP	Albania	Capore	29	0.19324	0.01515	ns
ChAIMAT	Albania	Mati	26	0.19339	0.01526	ns
ChTkABA	Turchia	Abaza	24	0.19504	0.01571	ns
ChFrCOR	Francia	Corsican	27	0.19520	0.01682	ns
ChDeBDE	Germania	German Alpine goat	28	0.19554	0.01714	ns
ChSpMLG	Spagna	Malagueña	26	0.19752	0.01572	ns
ChSaNAG	Arabia Saudita	Najrani	29	0.19759	0.01627	ns
ChSpPYY	Spagna	Payoya	27	0.19774	0.01700	ns
ChItCAM	Italia	Camosciata	28	0.19855	0.01670	ns
ChAILIQ	Albania	Ligenasi	29	0.19879	0.01678	ns
ChGrGRG	Grecia	Greek goat	29	0.19903	0.01664	ns
ChDeTWZ	Germania	Thuringian forest goat	27	0.19924	0.01743	ns
ChItGMO	Italia	Grigia Molisana	30	0.20254	0.01742	ns
ChItORO	Italia	Orobica	29	0.20293	0.01795	ns
ChItBIO	Italia	Bionda dell'Adamello	26	0.20318	0.01695	ns
ChSpVRT	Spagna	Verata	25	0.20355	0.01670	ns
ChTkGUR	Turchia	Gurcu	24	0.20380	0.01533	ns
ChAlHAS	Albania	Hasi	23	0.20402	0.01599	ns
ChItSAR	Italia	Sarda	29	0.20427	0.01612	ns
ChSpCDR	Spagna	Guadarrama	28	0.20440	0.01692	ns
ChFrPYR	Francia	Pyrenean	29	0.20456	0.01809	ns
ChAIMUZ	Albania	Muzhake	25	0.20562	0.01664	ns
ChItARG	Italia	Argentata dell'Etna	30	0.20598	0.01657	ns
ChChSGB	Svizzera	St. Gallen booted Goat	28	0.20602	0.01839	ns
ChPoBRA	Portogallo	Brava	19	0.20735	0.01607	ns
ChSaBES	Arabia Saudita	Beeshi	26	0.20807	0.01625	ns
ChAuPIZ	Austria	Pintzgauer	29	0.20936	0.01691	ns
ChTkHAI	Turchia	Hair	28	0.21180	0.01599	ns
ChChGRS	Svizzera	Grisou striped	27	0.21225	0.01792	ns
ChJoBAL	Giordania	Baladie	18	0.21425	0.01534	ns
ChRoCAR	Romania	Carpathian	22	0.23033	0.01662	p=0.0145 (VBN) ;0.38 (ANG)
ChAIDUK	Albania	Dukati	16	0.23136	0.01728	p=0.0145

Tabella 3.3: Numero di loci polimorfici ed eterozigosi attesa (con rispettivo errore standard S.E) delle razze analizzate.

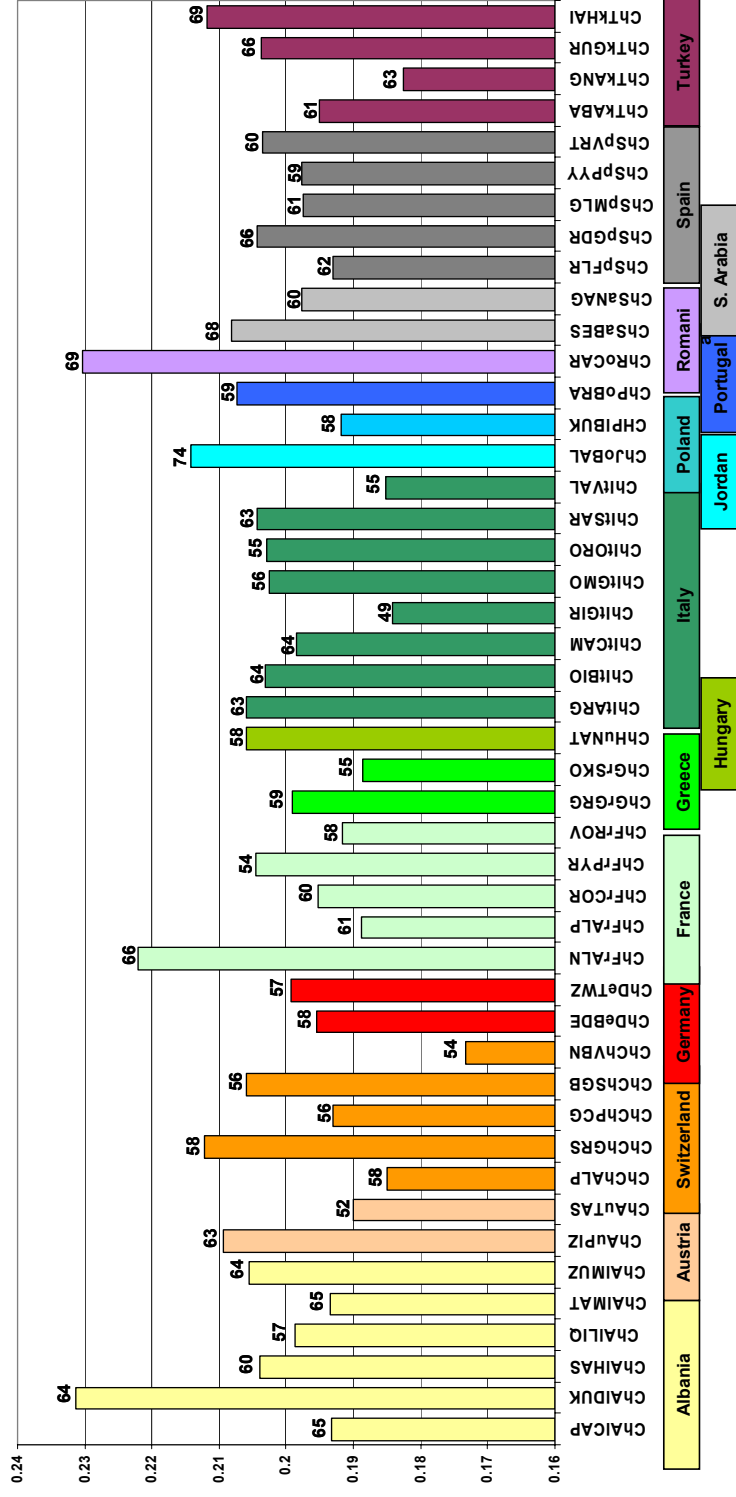


Figura 3.6: Rappresentazione grafica dell'eterozigosi attesa nelle diverse razze (a ogni colore corrisponde un diverso paese di provenienza). Sono stati inseriti anche i marcatori polimorfici per razza (indicati dal numero sopra ogni istogramma).

3.4 Similarità genetica (Jaccard)

Il coefficiente di similarità di Jaccard stima le differenze genetiche tra coppie di individui sulla base dei profili AFLP. I marcatori molecolari non sono in grado di distinguere tra alleli identici per discendenza ed identici di fatto, cioè uguali anche in individui non parenti perché presenti nella popolazione con una certa frequenza. La media delle similarità genetiche tra tutte le possibili coppie di individui all'interno di una razza può essere assunta come indice della diversità genetica entro razza.

I risultati ottenuti mediando le similarità entro ogni razza sono visualizzati nella tabella 3.8. Le razze provenienti dalla zona di domesticazione (Turchia, Giordania), quelle più orientali (Albania, Romania, Grecia) e delle isole in Italia sono quelle con coefficiente di similarità minore, e quindi con una maggiore variabilità entro razza. Le razze con maggiore similarità sono la Valais Black Neck Tedesca, la Tauernschecken Austriaca e la Girgentana e Valdostana Italiane. Alta similarità può essere indice di inbreeding, come confermato nelle razze citate precedentemente, in particolare nella Valais Black Neck, che presenta anche valori bassi di eterozigosi attesa .

Razza	Paese di origine	Similarità di Jaccard media
DUKATI	Albania	0,597596
HAIR	Turchia	0,607364
GURCU	Turchia	0,610974
BALADI	Giordania	0,616338
CARPATHIAN	Romania	0,620473
CABRA DEL GUADARRAMA	Spagna	0,62374
GREEK GOAT	Grecia	0,624877
ARGENTATA DELL'ETNA	Italia	0,626415
SARDA	Italia	0,626423
SWISS ALPINE	Svizzera	0,628045
GRISONS STRIPED	Svizzera	0,630934
PINZGAUER	Austria	0,631893
CORSICAN	Francia	0,633839
MUZHAK	Albania	0,635237
GRIGIA MOLISANA	Italia	0,640454
ROVE	Francia	0,641168
ST. GALLEN BOOTED GOAT	Svizzera	0,645012
CAMOSCIATA DELLE ALPI	Italia	0,645893
PEACOCK GOAT	Svizzera	0,646593
THURINGIAN FOREST GOAT	Germania	0,647519
VERATA	Spagna	0,648518
BIONDA DELL'ADAMELLO	Italia	0,649534
FRENCH ALPINE	Francia	0,651109
MALAGUEÑA	Spagna	0,653873
BRAVA	Portogallo	0,657309
OROBICA	Italia	0,658289
CAPORE	Albania	0,65834
SKOPELOS	Grecia	0,658589
ABAZA	Turchia	0,660325
HASI	Albania	0,666185
PYRENEAN	Francia	0,671234
GERMAN ALPINE	Germania	0,671467
ANGORA	Turchia	0,676071
FLORIDA	Spagna	0,678965
POLISH FAWN COLOURED GOAT	Polonia	0,68762
PAYOYA	Spagna	0,689919
VALAIS BLACK NECK	Svizzera	0,692829
GIRGENTANA	Italia	0,709517
TAUERNSCHECKEN	Austria	0,715894
VALDOSTANA	Italia	0,718891

Tabella 3.8: similarità media entro razza (Jaccard).

3.5 Analisi fattoriale delle corrispondenze (FCA)

La distribuzione spaziale degli individui appartenenti ad ogni razza è stata collocata in un sistema di assi (i primi due) in cui ogni individuo è rappresentato da un punto di colore diverso in funzione della razza di appartenenza. La figura 3.7 rappresenta l'analisi dei primi due assi rispetto alla massima dispersione dei dati della matrice binaria.

Il primo asse è quello che determina il maggior contributo all'inerzia totale (Fact 1=13.16%), mentre gli altri rappresentano percentuali sempre minori. L'inerzia cumulativa è espressa dalle percentuali poste sulla linea diagonale (per esempio l'insieme dei primi due assi rappresenta il 21.98% della dispersione).

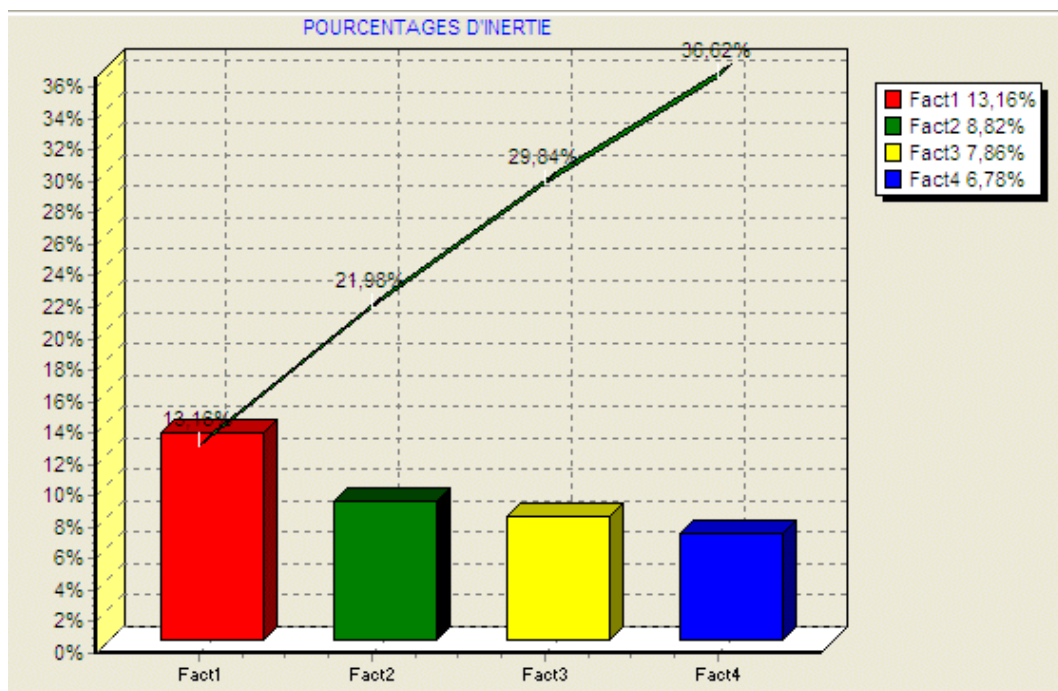


Figura 3.7: Prime quattro assi di varianza che rappresentano la massima dispersione dei dati: ogni istogramma riguarda la percentuale di inerzia rispettivamente del primo, secondo, terzo e quarto asse, mentre la linea diagonale mostra le percentuali cumulative date dalla somma degli assi.

L'analisi AFC evidenzia che individui appartenenti ad una stessa razza tendono a raggrupparsi. Un esempio è quello degli individui (rappresentati da punti rossi) delle razze Tauernschecker e Orobica ,come si vede nelle figure 3.8. Nella figura 3.9, in cui ogni individuo viene rappresentato con un colore diverso, è possibile vedere come la maggior parte degli individui si dispongono in una nuvola, mentre alcuni (appartenenti ad alcune razze) sono ai bordi della distribuzione (le precedentemente citate Orobica e Tauernschechen, il gruppo delle razze appartenenti alla zona di domesticazione e un gruppo di capre spagnole e greche.

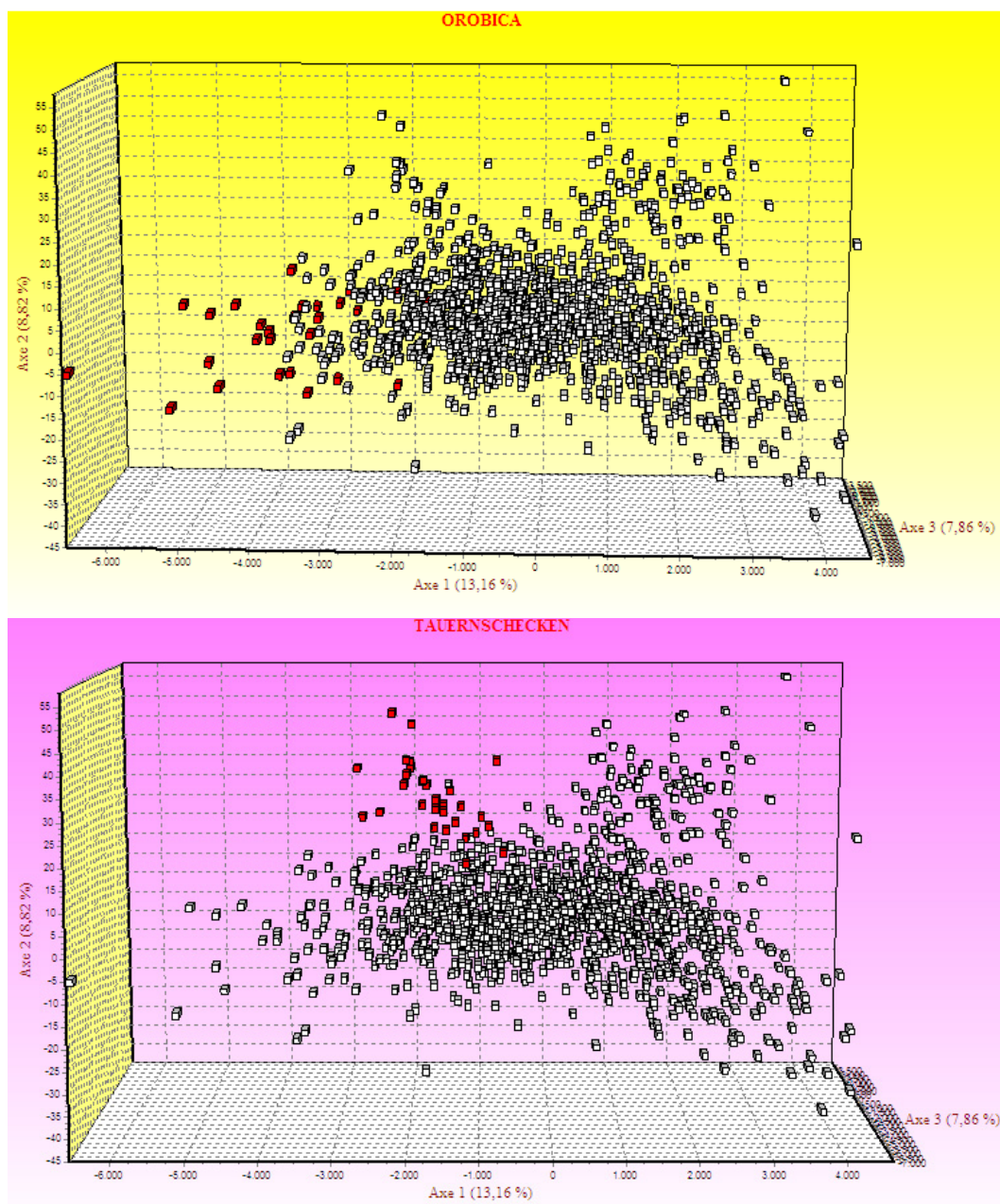


Figure 3.8: in rosso/scuro si distinguono gli individui appartenenti alle razze Orobica e Tauernschecken che si raggruppano in una zona specifica del diagramma.

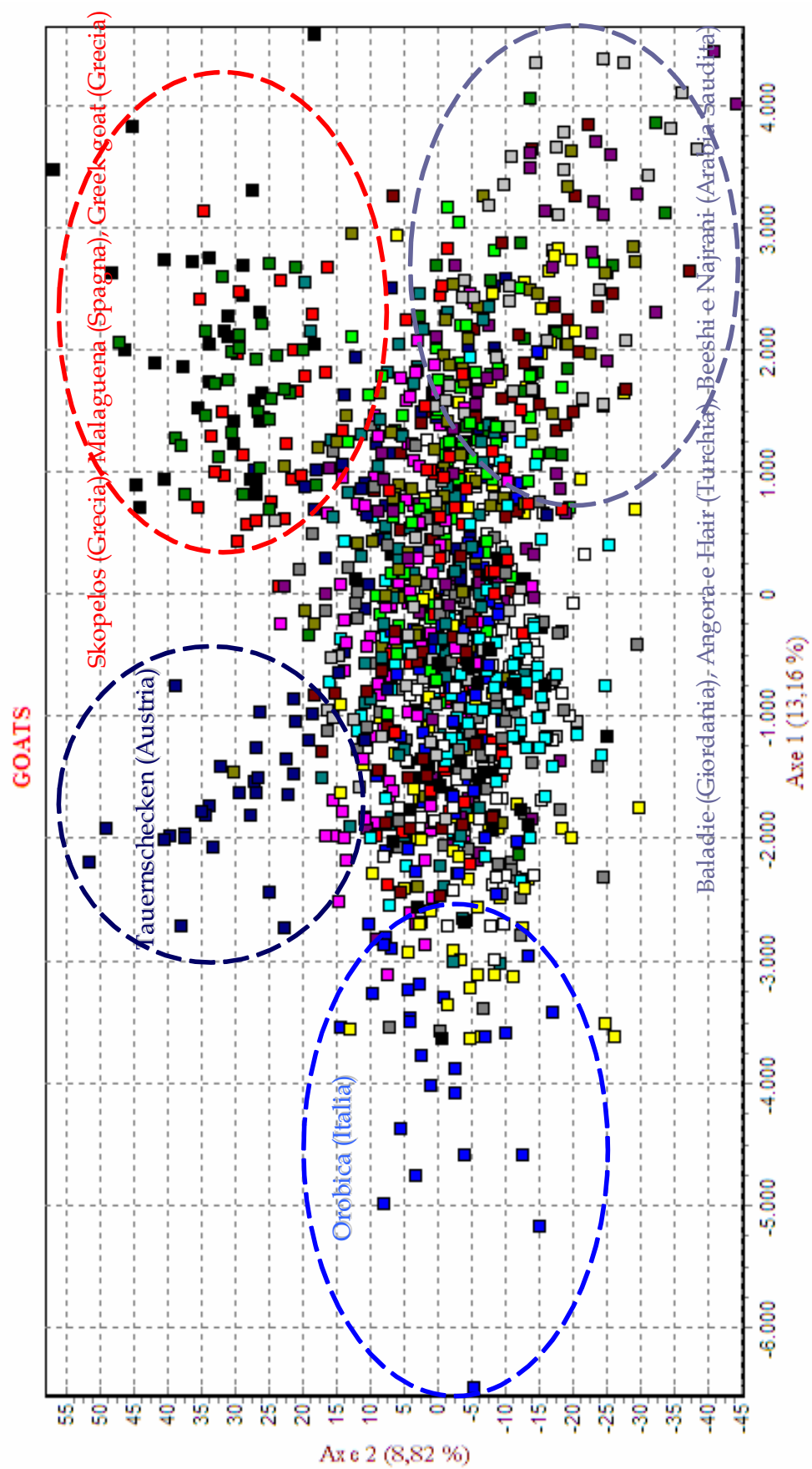


Figura 3.9: distribuzione degli individui appartenenti alle razze caprine secondo le prime 2 assi di dispersione (AFC) e raggruppamento di alcune razze ai bordi della nuvola

3.6 Analisi della composizione della variabilità genetica

Con il programma GENETIX è stato possibile misurare, a partire dalle frequenze alleliche ad ogni locus analizzato, la componente entro razze e tra razze della variabilità genetica. La misura della differenziazione delle popolazioni, come proporzione della diversità totale, è stata calcolata in base al coefficiente G_{st} di Nei e il coefficiente θ di Weir & Cockerham.

Il valore di differenziazione tra popolazioni G_{st} che è risultato essere 0.127 è stato supportato dall' F_{st} di Weir & Cockerham (θ) che è pari a 0.132. I valori di G_{st} indicano che la quasi totalità (87%) della variabilità genetica del campione analizzato è presente entro razza, la variabilità tra razze è quindi mediamente il 13% del totale. Tale valore è risultato leggermente minore rispetto a quanto determinato da Ajmone *et al.* (2001), in cui la variabilità all'interno delle razze caprine italiane era pari all'89%. In letteratura i dati riportati per la ripartizione della variabilità totale nelle due componenti riportano valori poco più alti di differenziazione tra razze. La relativamente bassa differenziazione tra razze è attribuibile all'elevato flusso genico tra le popolazioni ed alla pressione selettiva che agisce solo su poche regioni geniche. Tutto ciò risulta in una varianza maggiore tra individui che tra popolazioni. Infatti, secondo Hammond & Leight (1996) la variabilità nelle specie allevate entro-razza varia dal 50 al 70%.

3.7 Distanze genetiche tra razze

La distanza genetica tra le 47 razze è stata calcolata con la formula di Reynolds (1983) a partire dalle frequenze alleliche dei loci entro ogni razza. Al dataset (comprendente la razza *Alpine* in doppio) sono state aggiunte 2 razze africane (GAL-Boran Galla e SEA-Small East African) e una ungherese (Hungarian Native). I valori della distanza genetica tra razze sono stati rappresentati nel dendrogramma costruito con l'algoritmo NJ (Figura 3.9). Sono chiaramente visibili il cluster che raggruppa le razze africane e del vicino oriente (Turchie, dell'Arabia Saudita e della Giordania, insieme alle due africane) e quello delle capre albanesi e greche. E' presente un raggruppamento di alcune razze italiane, francesi e spagnole che provengono da una zona geografica che comprende l'Italia del nord-ovest, la Francia del sud, sud-ovest e la Spagna. Per esempio la Guadarrama e la Florida (Spagna), insieme alla Pyrenenne (Francia) hanno origini dal tronco pirenaico; difficile collocare la Payoya Andalus e la Grigio Molisana del Molise che sono molto più a sud rispetto alla distribuzione delle altre razze nello stesso cluster. Vicino al raggruppamento delle capre Alpine è presente un cluster comprendente le capre del centro Europa (Austria, Svizzera, Germania) e una razza italiana, l'Orobica, che si trova nello stesso ramo della austriaca Tauernschecken.

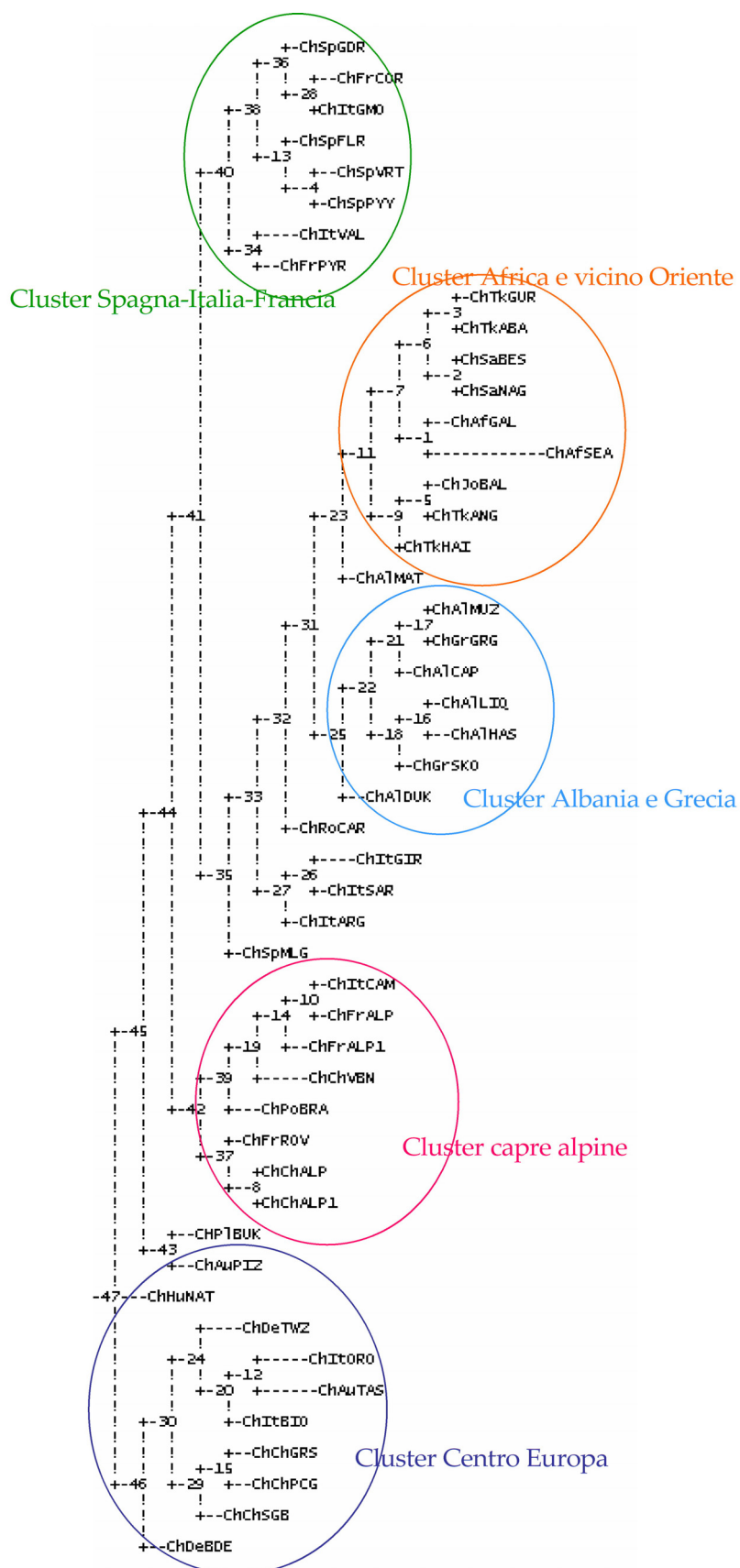


Figura 3.10: dendrogramma NJ costruito sulle distanze di Reynolds

3.8 Analisi genetica multivariata

Sulla base dei valori delle distanze genetiche grazie al programma STATISTICA è stata prodotta una rappresentazione grafica a due dimensioni in cui si possono visualizzare le prime due componenti principali della variabilità. L'analisi della prima componente principale spiega il 50.4% della varianza totale, mentre la seconda il 19.2% (Figura 3.8).

L'analisi della prima componente principale separa nettamente dalle altre la razza Italiana Orobica e l'Austriaca Tauernschecken che pur essendo considerate originali dell'arco alpino, mostrano i valori più bassi di distanze genetiche con le razze dell'est Europa analizzate. La seconda componente principale distribuisce le razze secondo un gradiente geografico; le razze campionate nella zona di domesticazione (Turchia, Arabia Saudita e Giordania) si raggruppano insieme e le altre popolazioni mostrano una distribuzione da sud a nord.

3.9 Descrizione delle razze Orobica e Tauernschecken

La capra Orobica o di Valgerola (Appendice A) è una razza autoctona originaria dell'omonima valle ed oggi diffusa nelle Prealpi Orobiche, in Valsassina ed in Valbrembana. Dal XIX secolo rimasta fino a tempi recenti circoscritta all'area molto limitata Valli del Bitto-Alta Val Brembana-Val Marrone. La razza Orobica è stata inserita in un programma regionale per

l'applicazione di misure agroambientali dell'UE in favore delle razze in via di estinzione ed è stata inserita nel Libro Genealogico della Specie Caprina.

La razza Tauernschecken è locale dell'Austria e diffusa in un areale ristretto: la valle del Rauris (Raurisertal) e le montagne Grossglockner. Sono presenti evidenze di allevamento di questa razza dal 1800 e le sue radici risalgono alla Austrian Landrace, la Pinzgauer e un antenato non ancora identificato (Figura 3.11). I dati forniti dal database EAAP annoverano la presenza di 200 femmine riproduttive e 80 maschi per la monta naturale. Wockac. *et al.* (2003) nel suo articolo sull'“importanza dell'inbreeding nelle capre Tauernschecken”, ha studiato questa razza Austriaca rara per cercare eventuale depressione da inbreeding. L'analisi è stata effettuata su 1749 animali nati nel periodo che va dal 1962 al 2002 basandosi su misure quali il fenotipo, la vitalità, la fecondità, la durata di vita, la fertilità e il numero della prole. Il grado di in incrocio è in accordo con quello trovato in altre specie rare (coefficiente di inbreeding del 5-6%), è stato quindi evidenziato come la razza Tauernschecken non soffra di depressione da inbreeding. Le stesse conclusioni sono emerse dall'analisi dei microsatelliti (dati Econogene): la razza Tauernschecken possiede il più basso valore Fis (Wright, 1951), parametro che identifica un difetto di eterozigoti all'interno delle popolazioni (causato per esempio da incrocio all'interno delle sottopopolazioni) e che quindi sottolinea l'assenza di inbreeding di questa razza.



Figura 3.11: esemplari di razza Tauernschecken.

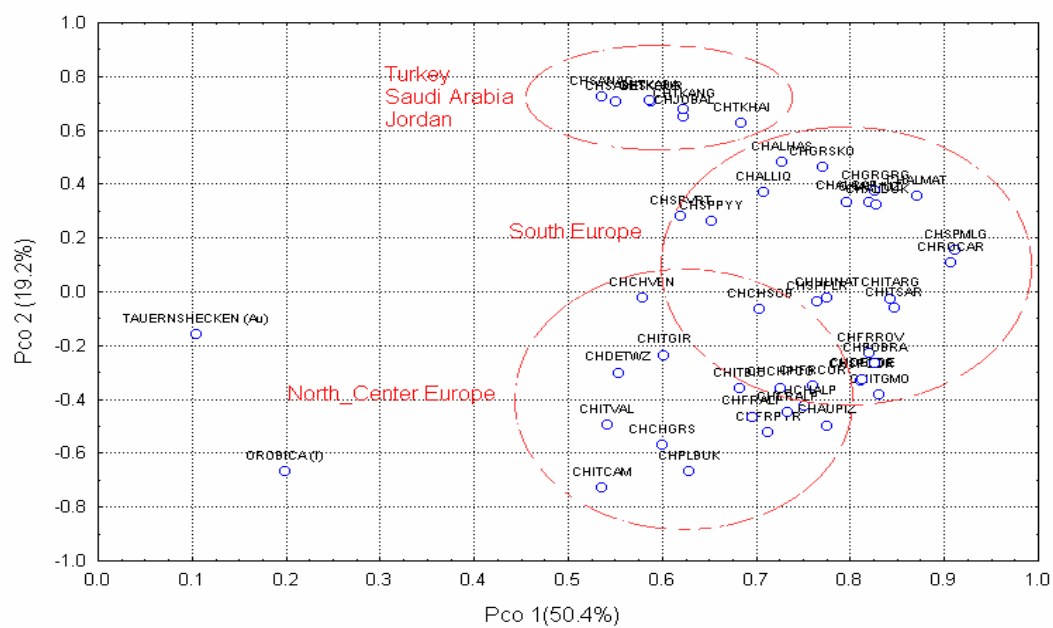


Figura 3.12: analisi delle prime 2 componenti principali basate sulle distanze genetiche di Reynolds.

3.10 Analisi integrata

Le coordinate delle componenti principali sono state rappresentate sui centroidi delle razze. I dati sono stati poi interpolati al fine di mettere in maggiore evidenza l'esistenza di *pattern* geografici. La prima componente principale rappresentata sulla cartina geografica (Figura 3.13 a) oltre al gradiente sud/nord già evidenziato in figura 3.12, permette di individuare un netto cambiamento nel valore delle coordinate in corrispondenza dello stretto del Bosforo e discontinuità evidenti nell'arco alpino, in corrispondenza delle razze Orobica (Italia) e Tauernschecken (Austria). Interessanti sono anche i *pattern* che si osservano nella zona più meridionale dell'Europa Mediterranea (Sicilia, Spagna, Portogallo), forse dovuti ad introgressioni di genotipi africani a seguito di migrazioni umane o commerci marittimi, ipotesi in ogni caso difficili da convalidare in assenza di informazioni sulle razze del nord-Africa.

La rappresentazione della seconda componente principale (19.2%, figura 3.13 b) mette in evidenza un gradiente parallelo a quello evidenziato dalla prima componente. Un sensibile cambiamento nel valore delle coordinate si nota in posizione più settentrionale, rispetto al Bosforo, in corrispondenza di Grecia ed Albania. È interessante notare come in questa zona Barbujani & Sokal (1990) abbiano individuato una barriera linguistica che divide il Nord della penisola greca (e parte dell'Albania) dal centro e dal sud. Le barriere linguistiche limitano gli scambi commerciali e culturali tra le popolazioni umane e di conseguenza limitano anche il flusso genico tra popolazioni animali vicine dal punto di vista geografico. Infatti, secondo Cavalli-Sforza *et al.* (1988) la migrazione umana e l'espansione di un popolo rispetto a un altro sono

strettamente associati alla comunicazione linguistica, che permette di diffondere le informazioni, favorire e migliorare i legami sociali.

La migrazione delle specie allevate è iniziata subito dopo la domesticazione, parallelamente alla diffusione dell'agricoltura da parte delle stirpi che popolavano la zona mediorientale della Mezzaluna Fertile (Ammerman & Cavalli-Sforza, 1984). I gradienti sud est/nord ovest osservati sono in accordo con il pattern di diffusione demica dell'agricoltura nel Neolitico. Le capre sono stati i primi animali zootecnici addomesticati, sono rustiche, in grado di tollerare condizioni ambientali estreme e sono facilmente trasportabili. È quindi ragionevole che abbiano seguito le migrazioni neolitiche dell'uomo che dal Medio Oriente ha raggiunto l'Europa e l'Asia. Non si può escludere però che l'accordo che si osserva tra i pattern di diversità ed i modelli attesi nel caso di espansione neolitica possa essere casuale. Inoltre le due componenti tra loro mostrano pattern paralleli che sono riconducibili ad eventi di migrazione indipendenti e molto probabilmente avvenuti in tempi diversi, per esempio durante il dominio dei Mori nella penisola balcanica ed iberica.

È interessante notare come i risultati ottenuti in questo studio con marcatori del genoma nucleare e nel lavoro di Ajmone Marsan *et al.* (2001, 2005) siano in netto contrasto con quelli derivanti dall'analisi del DNA mitocondriale. Luikart *et al.* (2001) infatti mette in evidenza come la variabilità nucleotidica del mtDNA delle razze caprine abbia una componente geografica trascurabile, al contrario di quanto osservato nel caso dei bovini (Loftus *et al.*, 1994) e delle pecore (Hiendleder S. *et al.*, 1998). Gli AFLP sono marcatori genomici e contribuiscono a dare informazioni sulla variabilità a livello dell'intero genoma, evidenziando anche la parte trasmessa dai riproduttori maschi, non rilevata dal DNA mitocondriale. La presenza di struttura

geografica nel DNA nucleare e l'assenza nel DNA mitocondriale non è facile da giustificare. Un'ipotesi possibile, in accordo con quanto sostenuto da Luikart e collaboratori (2001) è che trasporto e commercio abbiano riguardato principalmente le femmine, più docili e produttrici di latte. I responsabili della componente geografica della variabilità del genoma nucleare che osserviamo sarebbero quindi i maschi. In questo scenario le femmine in movimento venivano inseminate durante il viaggio da maschi stanziali, probabilmente selvatici nella zona medio-orientale e inselvatichiti in Europa. In effetti, gli archeologi Zeder & Hesse (2000) in siti della Mezzaluna Fertile hanno osservato una penuria di ossa di maschi adulti e un'abbondanza di ossa di giovani e di capre femmine. Questi dati suggeriscono che i maschi nati durante le migrazioni venivano preferibilmente consumati in fase giovanile e non trasportati con il resto del gregge.

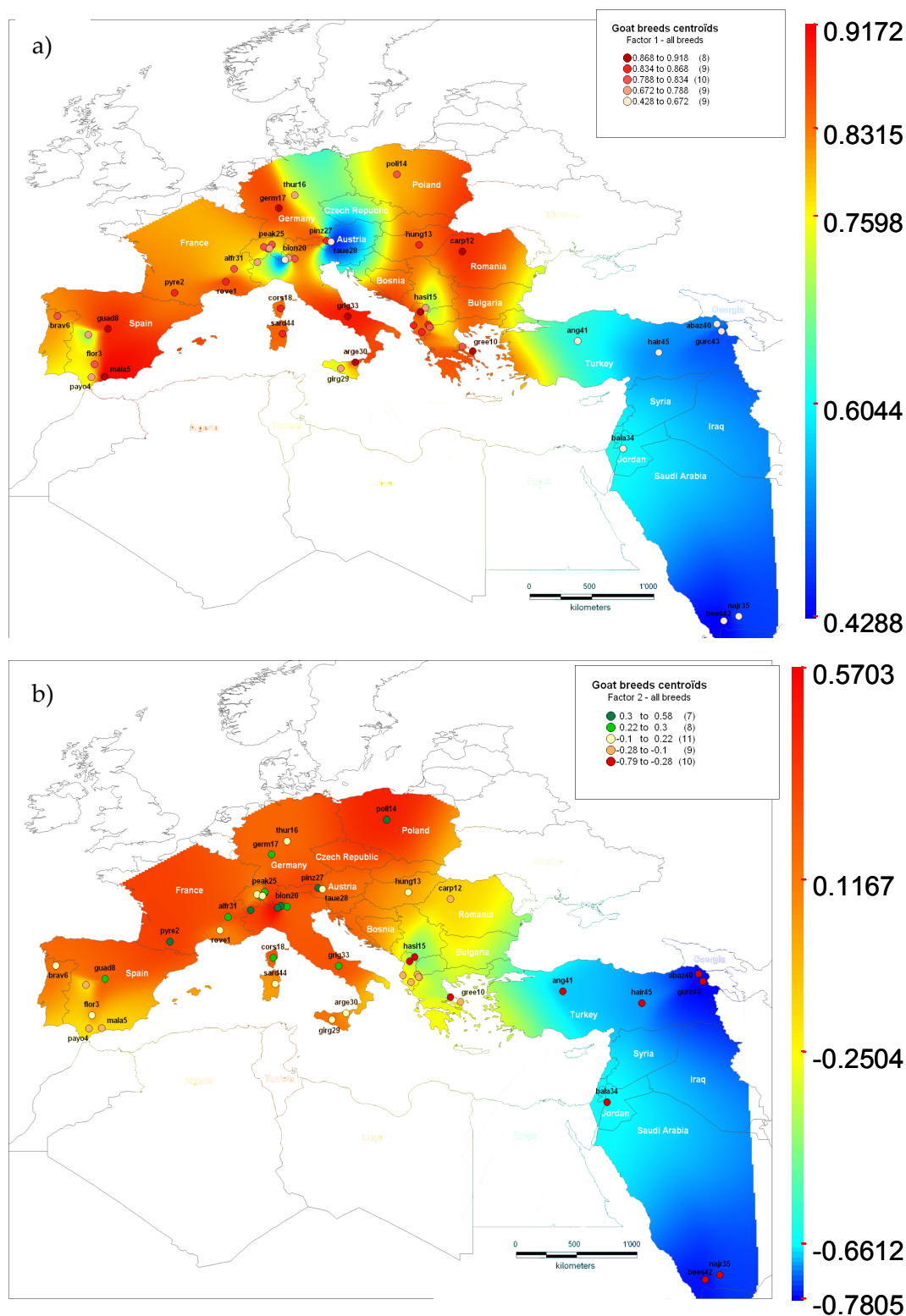


Figura 3.13: correlazioni dei centroide delle razze con le coordinate della prima componente principale (a, 50% della varianza) e della seconda (b, 19% della varianza). I valori delle coordinate correlate sono visibili nella didascalia dove colori diversi (che riempiono i centroide) rappresentano range di valori diversi; l'interpolazione Kriging (valori sulla colonna a destra) presenta invece una scala di colori al variare dei valori di correlazione.

3.11 Variabilità e conservazione

Assumendo che i polimorfismi ottenuti sono totalmente neutrali, restano 3 forze che possono aver influito sulla diversità osservata: la mutazione, la deriva e la migrazione. Nelle razze allevate, che hanno subito processi evolutivi relativamente recenti, le forze che hanno modificato i pool genici sono soprattutto la deriva genetica e il flusso genico. Purtroppo, considerando solo i dati derivanti dai marcatori neutrali, non vengono considerate quelle regioni del genoma sotto pressione selettiva (per esempio dovute all'adattamento a un particolare ambiente). Due criteri sono rilevanti per la conservazione delle razze:

- il livello molecolare, che considera le varianti alleliche che sono importanti per future richieste degli allevatori. La maggior parte della diversità genetica è ritrovata nel sud-est Europa e nel medio-oriente
- le razze che possiedono una unicità fenotipica e le migliori caratteristiche produttive. Queste razze sono principalmente presenti nel centro e nord Europa, ma possiedono una differenza media minore a livello delle sequenze.

La raccolta di campioni in aree marginali e rurali ha permesso di studiare e valorizzare le razze meno conosciute sia come risorsa genetica che del territorio per un'agricoltura sostenibile.

4. Conclusioni

A livello europeo l'attenzione verso un'agricoltura sostenibile e la promozione e il mantenimento delle risorse genetiche delle razze zootecniche sta crescendo. Il presente lavoro si inserisce in questa ottica, e si propone di analizzare a livello genetico la variabilità dei piccoli ruminanti.

Le aree considerate marginali, che da tempo rappresentano la culla di razze locali ben adattate, sono attualmente a rischio di perdita di biodiversità sia a causa dell'“invasione” delle razze non native e più produttive che dell'abbandono da parte degli allevatori delle zone rurali e agricole. L'erosione genetica delle razze allevate è dovuta a fenomeni naturali che modificano i pool genici, ma soprattutto alla pressione selettiva dell'uomo (controllo della riproduzione per la selezione di razze omogenee e altamente produttive). Molto frequente nelle razze allevate è la depressione da inbreeding provocata proprio dal controllo della riproduzione e dallo squilibrio tra maschi e femmine negli allevamenti.

Il progetto europeo ECONOGENE (*Sustainable conservation of animal genetic resources in marginal rural areas: integrating molecular genetics, socio-economics and geostatistical approaches*) si basa sull'integrazione di diverse discipline: la genetica, l'economia e la geo-statistica per descrivere la situazione delle razze marginali di capre e pecore presenti in Europa e nei paesi del bacino del Mediterraneo.

Le capre costituiscono, tra le razze allevate, quelle con maggiori caratteristiche di rusticità e maggiore adattabilità. Sono diffuse in ambienti limite (deserti, alta montagna) e spesso distribuite in aree molto ristrette. Nel database creato dall'Associazione Europea delle Produzioni Animali (EAAP) sono state raggruppate 158 razze di cui il 35% è stato stimato a rischio di estinzione.

La caratterizzazione della variabilità genetica mediante marcatori neutri permette di studiare a livello molecolare le diversità della parte non codificante del genoma. I marcatori neutri più sfruttati sono i microsatelliti e gli AFLP. Gli AFLP sono normalmente utilizzati per studiare razze e popolazioni di cui non si hanno informazioni di sequenza; sono caratterizzati da alta ripetibilità e permettono, in un unico esperimento, di individuare un numero elevato di polimorfismi analizzando molti loci contemporaneamente.

Nel presente lavoro sono stati sfruttati i dati molecolari ottenuti con i marcatori AFLP per lo studio della biodiversità secondo diversi aspetti:

- monitoraggio della variabilità entro popolazione;
- studio dell'evoluzione e della migrazione delle razze;
- identificazione delle popolazioni con caratteristiche genetiche uniche.

Il campionamento in un'area molto ampia, 15 paesi, 47 popolazioni (di cui 43 native delle aree marginali) e 1504 animali, che comprende gli stati del centro Europa e del bacino del Mediterraneo, ha permesso di poter effettuare uno studio approfondito della biodiversità delle razze caprine.

I valori di G_{st} indicano che la quasi totalità (84%) della variabilità genetica dei campioni analizzati è presente entro razza, in linea con altri lavori precedentemente effettuati che calcolano la diversità tra razze nell'ordine del

10-30%. Questo effetto è dovuto principalmente all'alto flusso genico tra le popolazioni allevate e a migrazioni di animali e di allevatori spesso non documentati. Inoltre le razze allevate, pur soggette a selezione artificiale e controllo della riproduzione, posseggono una variabilità elevata, proprio perché la selezione artificiale agisce su pochi loci.

L'analisi dell'eterozigosità ha permesso di evidenziare come le razze Valais Black Neck e Angora presentino valori significativamente minori di eterozigosi attesi rispetto alle razze Dukati e Carpathian. In base alle distanze genetiche (calcolate secondo Reynolds dalla matrice di dati AFLP) è stata inoltre evidenziata la netta diversità delle razze caprine Tauernschecken e Orobica rispetto alle altre razze ed è stato possibile individuare un gradiente di diversità genetica (attraverso analisi PCA) dal centro di domesticazione alle zone dell'Europa centrale.

Le informazioni ottenute con i marcatori molecolari possono essere utilizzate per caratterizzare la biodiversità delle capre grazie anche all'utilizzo di approcci integrati. L'informazione genetica può essere legata a quella geografico-spaziale fornita dal GIS (geographic information system) attraverso interpolazione. Lo scopo di questo approccio integrato è quello di definire a livello geografico la variabilità genetica delle popolazioni e quindi "posizionare" e "localizzare" l'informazione genetica nello spazio. La distanza genetica integrata alle mappe geografiche ha permesso di ottenere informazioni utili sugli spostamenti delle razze caprine (che sono strettamente legate alle migrazioni umane) e sulla loro distribuzione, e a stabilire le priorità di conservazione delle popolazioni con maggior "patrimonio genetico".

Secondo l'approccio conservazionistico di Weitzmann le razze Tauernschecken e Orobica hanno la priorità in quanto posseggono

caratteristiche di unicità e diversità rispetto alle altre. Anche in base ai dati ottenuti con i microsatelliti è stato possibile evidenziare queste due razze, in particolare per la Tauernschecken è stato calcolato un valore di Fis basso (che indica difetto di omozigoti e quindi basso effetto dell' inbreeding).

I dati ottenuti con i marcatori AFLP saranno integrati con quelli conseguiti, all'interno del progetto ECONOGENE, con altri marcatori molecolari (microsatelliti, SNPs, marcatori sul cromosoma Y e sul mitocondriale). Inoltre la possibilità di integrazione con i dati socio-economici le informazioni geo-statistiche, permetterà di individuare le priorità di conservazione e promuovere lo sviluppo sostenibile delle risorse caprine locali e delle aree marginali in cui vivono.

Bibliografia

- Ajmone Marsan P., Negrini R., Crepaldi P., Milanesi E., Gorni C., Valentini A., Cicogna M. *Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers* ANIMAL GENETICS 2001, Vol. 32: 281-288;
- Ajmone Marsan P., Negrini R., Milanesi E., Crepaldi P., Cicogna M., Zagdsuren Y., Ertugrul O, Luikart G., Taberlet P. *Geographic structure in goat diversity as revealed by AFLP molecular markers* PROCEEDINGS OF THE 7TH WORLD CONGRESS OF GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION 2004 August 19-23, Montpellier, France;
- Ajmone Marsan P., Negrini R., Milanesi E., Gorni C., Luikart G. *Genetic diversity in goats: comparison between Italian, Asian and African populations* PROCEEDINGS OF THE A.S.P.A. XIV CONGRESS FIRENZE 2001 June 12-15, pagg. 67-69;
- Ajmone-Marsan P., Valentini A., Cassandro M., Vecchiotti Antaldi G., Bretoni G., Kuiper M. *AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle* ANIMAL GENETICS 1997, Vol 28: 418-426;
- Ajmone-Marsan P., Valentini A., Cassandro M., Vecchiotti-Antaldi G., Bertoni G., Kuiper M. *AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle* ANIMAL GENETICS 1997, Vol.. 28: 418-426;
- Amills M., Jimenez N., Jordana J., Riccardi A., Fernandez-Arias A., Guiral J., Bouzat J.L. *Low diversity in the major histocompatibility complex class II DRB1 gene of the spanish ibex, Capra pyrenaica* HEREDITY 2004, Vol. 93: 266-272;
- Ammerman A.J. & Cavalli-Sforza L.L. *The neolithic transition and the genetics of population in Europe* PRINCETON UNIVERSITY PRESS, PRINCETON NJ, 1984;

- Andersson L. *Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals* NATURE REVIEWS GENETICS 2001, Vol. 2: 130-138;
- Andrienko, G. & Andrienko, N., *Geo-visualization support for multidimensional clustering* Proc. 12th Int. Conf. on Geoinformatics - GEOSPATIAL INFORMATION RESEARCH 2004, Bridging the Pacific and Atlantic University of Gävle, Sweden;
- Aurelle D., Lek S., Giraudel J.L., Berrebi P. *Microsatellite and artificial neural networks: tools for the discrimination between natural and hatchery brown trout (Salmo trutta L.) in Atlantic populations* ECOL. MODEL. 1999, Vol. 120: 313-324;
- Balloux F. & Lugon-Moulin N. *The estimation of population differentiation with microsatellite markers* MOLECULAR ECOLOGY 2002, Vol. 11: 155-165;
- Bamshad M. and Wooding S.P. *Signatures of natural selection in the human genome* NATURE REVIEWS GENETICS 2003 February, Vol. 4: 99-111;
- Barbujani G. & Sokal R.R. *Zones of sharp genetic change in Europe are also linguistic boundaries* PNAS USA 1990, Vol. 87: 1816-1819;
- Barker J.S.F., Tan S.G., Moore S.S., Mukherjee T.K., Matheson J.L., Selvaraj O.S. *Genetic variation within and relationships among populations of Asian goats (Capra hircus)* JOURNAL OF ANIMAL BREEDING GENETICS 2001, Vol. 118: 213-233;
- Beaumont M.A. & R.A. Nichols *Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure*. PROC. R. SOC. LOND. B 1996, Vol. 263: 1619-1626;
- Beaumont M.A. & Rannala B. *The Bayesian revolution in genetics* NATURE GENETICS REVIEWS 2004 April, Vol 5: 251-261;
- Becker J, Vos P, Kuiper M, Salamini F, Heun M *Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley* MOLECULAR GENETICS & GENOMICS 1995 November 1, Vol 249(1):65-73;

- Becker, C. D. & Elinor O. *Human Ecology and Resource Sustainability: The Importance of Institutional Diversity* ANNUAL REVIEW OF ECOLOGY AND SYSTEMATICS 1995, Vol. 26: 113-33;
- Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L., Bonhomme, F. GENETIX, Version 4.05.2, 2004; logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. <http://www.univmontp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>. Ststus: 29.05.05;
- Bensch S. and Akesson M. *Ten Years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals?* MOLECULAR ECOLOGY 2005, Vol 14:2899-2914;
- Benzécri J.P *Correspondence Analysis* HANDBOOK NEW-YORK 1992
- Bertaglia M., Roosen J. *Applying multigenic methodologies to complex social-environmental problems: the valuation and conservation of animal genetic resources in European marginal areas* 2002, IN PRESS;
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms* AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 1980 May, Vol. 32(3):314-31;
- Bradley D.G., MacHugh D.E., Cunningham P., Loftus R.T. *Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle* PNAS U S A 1996 May 14, Vol. 93(10): 5131-5135;
- Bruford M.W. *Conservation genetics of UK livestock: from molecules to managements* FARM ANIMAL GENETIC RESOURCES Eds G. Simm, B. Villanueva and S. Townsend. Nottingham University Press, Nottingham, UK 2004 Chapter 11: 151-169;
- Bruford MW, Bradley DG, Luikart G. *DNA markers reveal the complexity of livestock domestication* NAT REV GENET. 2003 November, Vol. 4(11):900-10;
- Buntjer J.B., Hoff I.A., Lenstra J.A. *Artiodactyl interspersed DNA repeats in cetacean genomes* JOURNAL OF MOLECULAR EVOLUTION 1997 Jul, Vol. 45(1):66-9;

- Caballero A. & Toro M.A. *Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations* CONSERVATION GENETICS 2002, Vol. 3: 289-299;
- Cañon J., Alexandrino P., Bessa I., Carleos C., Carretero Y., Dunner S., Ferran N., Garcia D., Jordana J., Laloë D., Pereira A., Sanchez A., Moazami-Goudarzi K.. *Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes*. GENETICS, SELECTION AND EVOLUTION 2001, Vol. 33: 311-332;
- Cavalli-Sforza L.L. *Population structure and human evolution* PROC R SOC LOND B BIOL SCI. 1966 March 22; Vol 164(995): 362-79;
- Cavalli-Sforza L.L., Piazza A., Menozzi P., Mountain J. *Reconstruction of human evolution: bringing together genetic, archaeological and linguistic data* PNAS USA 1988 August, Vol. 85: 6002-6006;
- Chapin III F.S., Zavaleta E.S., Eviner V.T., Naylor R.L., Vitousek P.M., Reynolds H.L., Hooper D.U., Lavorel S., Sala O.E., Hobbie S.E., Mack M.C., Diaz S. *Consequences of changing biodiversity* NATURE 2000 May 11, Vol. 405: 234-242;
- Chikhi L. & Bruford M. *Mammalian population genetics and genomics* MAMMALIAN GENOMICS Edited by A. Ruvinsky and J.A. Marshall Graves CABI publishing Chapter 21;
- Congiu L., Dupanloup I., Patarnello T., Fontana F., Rossi R., Arlati G., Zane L. *Identification of interspecific hybrids by AFLP: the case of sturgeon* MOLECULAR ECOLOGY 2001, Vol. 10: 2355-2359;
- Crepaldi P., Gemo G., Brambilla L., Cicogna M., Renieri C. *Caratterizzazione della capra Val di Livo: profilo fenotipico visibile e misure somatiche* ZOOTECNICA E NUTRIZIONE ANIMALE 1999, Vol. 25: 229-242;
- De La Vega F. M., Lazaruk K. D., Rhodes M. D., Wenz M. H. *Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan® SNP Genotyping*

- Assays and the SNPlex™ Genotyping System* MUTATION RESEARCH 2005, Vol. 573: 111–135;
- Eding H., Crooijmans R.P.M.A., Groener M.A.M., Meuwissen T.H.E. *Assessing the contribution of breeds to genetic diversity in conservation schemes* GENETICS SELECTION & EVOLUTION 2002, Vol. 34: 613-633;
 - Edwards A.W. F. *The fundamental theorem of natural selection* THEORETICAL POPULATION BIOLOGY 2002, Vol. 61: 335-337;
 - Eldredge N. *La vita sulla terra: un'enciclopedia della biodiversità dell'ecologia e dell'evoluzione* CODICE EDIZIONI TORINO 2004;
 - Ellegren H., Smith N.G.C., Webster M.T. *Mutation rate variation in the mammalian genome* CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT 2003, Vol. 13: 562-568;
 - Felsenstein J. *PHYLYP: phylogeny inference package (Version 3.2)* CLADISTICS 1989, Vol. 5: 164-166;
 - Fisher R.A. *The genetical theory of natural selection* CLARENDON, OXFORD, 1930 [2nd ed., DOVER, NEW YORK, 1958; variorum ed., OXFORD UNIVERSITY PRESS, 1999];
 - Fry NK, Afshar B, Visca P, Jonas D, Duncan J, Nebuloso E, Underwood A, Harrison TG *Assessment of fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis for epidemiological genotyping of Legionella pneumophila serogroup 1* CLIN MICROBIOL INFECT. 2005 September, Vol. 11(9):704-12;
 - Gandini G.C., Ollivier L., Danell B., Distl O., Georgoudis A., Groeneveld E., Martyniuk E., van Arendonk J.A.M., Woolliams J.A. *Criteria to assess the degree of endangerment of livestock breed in Europe* LIVESTOCK PRODUCTION SCIENCE 2004, Vol. 91: 173-182;
 - García D., Corral N., Cañon J. *Further developments on Weitzman's approach to assess conservation of genetic diversity.* PROCEEDINGS OF THE 7TH WORLD

CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, MONTPELLIER, FRANCE, August 19-23, 2002. Vol. XXXIII, 2002 pp 561-564.

- Garza JC, Williamson EG, *Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci* MOL ECOL 2001 February;10(2):305-18;
- Grant PR, Grant BR, Petren K, *A population founded by a single pair of individuals: establishment, expansion, and evolution.* GENETICA 2001;112-113:359-82;
- Haenlein G.F.W. *Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research* JOURNAL OF DAIRY SCIENCE 2001, Vol. 84: 2097-2115;
- Haliassos A., Chomel J.C., Tesson L., Baudis M., Kruh J., Kaplan J.C. and Kitzis A. *Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations* NUCLEIC ACIDS RESEARCH 1989, Vol. 17, 3606;
- Hall S.J.G. & Bradley D.G. *Conserving livestock breed biodiversity* TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION 1995, Vol. 10(7): 267-270;
- Hall S.J.G. & Ruane J. *Livestock breeds and their conservation: a global overview* CONSERVATION BIOLOGY 1993, Vol. 7(4): 815-825;
- Hammond K. & Leitch H. *The FAO Global Programme for the Management of Farm Animal Genetic Resources* In: MILLER R., V. PURSEL, AND H. NORMAN (EDS.), 1996 AGRICULTURAL RESEARCH. XX. BIOTECHNOLOGY'S ROLE IN THE GENETIC IMPROVEMENT OF FARM ANIMALS. AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, pagg: 24-42;
- Hammond P.M. *Practical approaches to the estimation of the extent of biodiversity in speciose groups* PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON 1994, Vol. B 345: 119-136;
- Harris H. *Enzyme polymorphism in man* PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B 1966, Vol. 164: 298-310;

- Hector A., Joshi J., Lawler S.P., Spehn E.M., Wilby A. *Conservation implication of the link between biodiversity and ecosystem functioning* OECOLOGIA 2001, Vol. 129: 624-628;
- Herrera M., Rodero E., Gutierrez M.J., Pena F., Rodero J.M. *Application of multifactorial discriminant analysis in morpho-structural differentiation of Andalusian caprine breeds* SMALL RUMINANT RESEARCH 1996, Vol. 22: 39-47;
- Herrmann D, Boller B, Widmer F, Kolliker R *Optimization of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover* GENOME 2005 June, Vol. 48(3):474-86;
- Hill WG, Weir BS *Moment estimation of population diversity and genetic distance from data on recessive markers*. MOLECULAR ECOLOGY 2004 April, Vol. 13(4): 895-908;
- Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. *Molecular systematics* SINAUER ASSOCIATES, SUNDERLAND 1996;
- Hiendleder S., Lewalski H., Wassmuth R., Janke A. *The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (Ovis aries) and comparison with the other major ovine haplotype*. J MOL EVOL. Oct 1998, Vol. 47(4):441-8;
- Hoffmann M.H., Glass A.S., Tomiuk J., Schmuths H., Fritsch R.M., Bachmann K. *Analysis of molecular data of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. (Brassicaceae) with Geographical Information Systems (GIS)*. MOLECULAR ECOLOGY 2003, Vol. 12 (4): 1007-1019;
- Holder M. Lewis P.O. *Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches* NATURE REVIEWS GENETICS 2003 April, Vol. 4: 275-284;
- Holsinger K.E., Lewis P.O., Dey D.K. *A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers* MOLECULAR ECOLOGY 2002, Vol. 11: 1157-1164;

- Hosmer, D.W., Lemeshow, S. *Applied logistic regression*, 2000 JOHN WILEY & SONS, NEW YORK;
- Innan H. & Kim Y. *Pattern of polymorphism after strong artificial selection in a domestication event* PNAS 2004 July 20, Vol. 101 (29): 10667-10672;
- Jaccard, P. *Nouvelles recherches sur la distribution florale*. BUL. SOC. VAUDOISE SCI. NAT. 1908 Vol 44:223–270;
- Jobling M.A. & Tyler-Smith C. *The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age* NATURE REVIEW GENETICS 2003 August, Vol. 4: 598-612;
- Jobling M.A., Hurles M.E., Tyler-Smith C. *Human evolutionary genetics* GARLAND PUBLISHING 2004;
- Joost S. & the Econogene Consortium *Combining biotechnologies and GIScience for livestock genetic resources conservation* 2005 IN PRESS;
- Kimura M. *Molecular evolutionary clock and the neutral theory* JOURNAL OF MOLECULAR EVOLUTION 1987, Vol. 26(1-2):24-33;
- Krauss S.L. *Complete exclusion of nonsires in an analysis of paternity in a natural plant population using amplified fragment length polymorphism (AFLP)* MOLECULAR ECOLOGY 1999, Vol. 8: 217-226;
- Krieger M.J. & Ross K.G. *Identification of a major gene regulating complex social behaviour* SCIENCE 2002, Vol. 295: 328-332
- Landegren U., Nilsson M., Kwok P.Y. *Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis* GENOME RESEARCH 1998 August 8, (8):769-76;
- Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A. *Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication* SCIENCE 2005 March 11, Vol. 307(5715):1618-21;

- Laval G., Iannuccelli N., Legault C., Milan D., Groenen M.A.M., Giuffra E., Andersson L., Nissen P.H., Jorgensen C.B., Beeckmann P., Geldermann H., Foulley J.L., Chevalet C., Ollivier L. *Genetic Diversity of Eleven European Pig Breeds*. GENETICS, SELECTION AND EVOLUTION 2000, Vol. 32: 187-203;
- Li M-H., Zhao S-H., Bian C., Wang H-S., Wei H., Liu B., Yu M., Fan B., Chen S-L., Zhu M-J., Li S-J., Xiong T-A., Li K. *Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite analysis* GENETIC SELECTION & EVOLUTION 2002, Vol. 34, 729-744;
- Linch M. & Milligan B.G. *Analysis of population genetic structure with RAPD markers* MOLECULAR ECOLOGY 1994, Vol. 3: 91-99
- Liu B.H. *Statistical genomics. Linkage mapping and QTL analysis* CRC PRESS, BOCA RANTON, NEW YORK 1997;
- Loftus R.T., MacHugh D.E., Bradley D.G., Sharp P.M., Cunningham P. *Evidence for two independent domestication of cattle* PNAS U S A 1994 March 29, Vol. 91(7): 2757-2761;
- Lucchini V. *AFLP: a useful tool for biodiversity conservation and management* COMPTES RENDUS BIOLOGIES 2003, Vol. 326: S43-S48;
- Luikart G., Gielly L., Excoffier L., Vigne J-D., Bouvet J., Taberlet P. *Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats* PNAS 2001 May 8, Vol. 98 (10): 5927-5932;
- Luikart G., Gielly L., Excoffier L., Vigne J-D., Bouvet J., Taberlet P. *Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats* PNAS 2001, Vol. 98: 5927-5932;
- Luikart G., England P.R., Tallmon D., Jordan S., Taberlet P. *The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing* NATURE REVIEWS GENETICS 2003 December, Vol. 4: 981-994;

- Lynch M, Milligan BG *Analysis of population genetic structure with RAPD markers* MOLECULAR ECOLOGY 1994 April; Vol. 3(2): 91-9;
- MacHugh D.E., Loftus R.T., Bradley D.G., Sharp P.M. & Cunningham P. *Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds* PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON B 1994, Vol. 256: 25–31;
- MacHugh D.E., Shriver M.D., Loftus R.T., Cunningham P. and Bradley D.G. *Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and Zebu cattle (Bos taurus and Bos indicus)* GENETICS 1997, Vol. 146: 1071-1086;
- Mannen H., Nagata Y., Tsuji S. *Mitochondrial DNA reveal that domestic goat (Capra hircus) are genetical affected by two subspecies of bezoar (Capra aegagrus)* BIOCHEMICAL GENETICS 2001, Vol. 39(5/6): 145-154;
- Mariette S., Le Corre V., Austerlitz F., Kremer A. *Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers* MOLECULAR ECOLOGY 2002, Vol. 11: 1145-1156;
- Marklund L., Moller M.J., Sandberg K., Andersson L. *A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses* MAMMALIAN GENOME 1996 December, Vol. 7(12): 895-899;
- Mason, I.L. *World Dictionary of Livestock Breeds*, 1988 Third Edition. C.A.B International;
- Meksem K., Leister D., Peleman J., Zabeau M., Salamini F., Gebhardt C. *A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers.* MOLECULAR GENOMICS & GENETICS 1995 Nov 1, Vol. 249(1):74-81;
- Mignon-Grasteau S., Boissy A., Bouix J., Faure J-M., Fisher A.D., Hinch G.N., Jensen P., Le Neindre P., Mormède P., Prunet P., Vandeputte M., Beaumont

- C. *Genetics of adaptation and domestication in livestock* LIVESTOCK PRODUCTION SCIENCE 2005, Vol. 93: 3-1;
- Morin P.A., Luikart G., Wayne R.K. and SNP working group *SNPs in ecology, evolution and conservation* TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION 2004 April, Vol. 4 (19): 208-216;
 - Moritz C. *Defining evolutionary significant units for conservation* TRENDS IN ECOLOGY AND EVOLUTION 1994, Vol. 9: 373-375;
 - Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. *AFLP genotyping and fingerprinting* TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION 1999, Vol. 14: 389-395;
 - Mullis K.B. and Faloona F.A. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction* METHODS ENZYMOL 1987, Vol. 155:335-350;
 - N. Ihara, A. Takasuga, K. Mizoshita, H. Takeda, M. Sugimoto, Y. Mizoguchi, T. Hirano, T. Itoh, T. Watanabe, K. M. Reed, W. M. Snelling, S. M. Kappes, C. W. Beattie, G. L. Bennett, and Y. Sugimoto *A Comprehensive Genetic Map of the Cattle Genome Based on 3802 Microsatellites* GENOME RESEARCH 2004 October 1, Vol. 14(10a): 1987-1998;
 - Nagamine Y. & Higuchi M. *Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers* JOURNAL OF ANIMAL BREEDING GENETICS 2001, Vol. 118: 101-109;
 - Negrini R., Milanesi E., Pellecchia M., Patrini M., Crepaldi P., Joost S., Ajmone Marsan P., ECONOGENE Consortium *Pattern of ancient goat migration revealed by AFLP molecular markers* PROCEEDINGS OF THE A.S.P.A. XVI CONGRESS TORINO 2005 JUNE 28-30, pagg. 55-57;
 - Nei M. & Kumar S. *Molecular Evolution and phylogenetics* OXFORD UNIVERSITY PRESS Oxford 2000;
 - Nei M. *Molecular evolutionary genetics* COLUMBIA UNIVERSITY PRESS NY 1987;

- Nei M. *The theory and estimation of genetic distance* GENETIC STRUCTURE OF POPULATIONS 1973, Edited by N.E.MORTON, UNIVERSITY HAWAII PRESS, HONOLULU;
- Nevo E. *Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress* PNAS 2001 May 22, Vol 98(11): 6233-6240;
- Nordstrom T, Ronaghi M, Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R, Nyren P, *Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing*. BIOTECHNOLOGY APPLIED BIOCHEMISTRY 2000 April;31 (Pt 2):107-12;
- O'Hanlon P. & Peakall R. *A simple method for the detection of size homoplasy among amplified fragment length polymorphism fragments* MOLECULAR ECOLOGY 2000, Vol. 9: 815-816;
- Ofir R., Wong A.C., McDermid H.E., Skorecki K.L., Selig S., *Position effect of human telomeric repeats on replication timing* P N A S USA 1999 September 28, Vol. 96(20):11434-9;
- Oldenbroek J.K. *Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources* ID-DLO 1999;
- Otsen M., den Bieman M., Kuiper M.T.R., Pravenec M., Kren V., Kurtz T.W., Jacob H.J., Lankhorst A.E., van Zutphen B.F.M. *Use of AFLP markers for gene mapping and QTL mapping in rat* GENOMICS 1996, Vol. 37:289–294;
- Ouafi A.T., Babilliot J.-M., Leroux C., Martin P. *Genetic diversity of the main Moroccan goat breeds: phylogenetic relationships with four breeds reared in France* SMALL RUMINANT RESEARCH, 45, 225-233;
- Pakniyat H., Powell W., Baird E., Handley L.L., Robinson D., Scrimgeour C.M., Nevo E., Hackett C.A., Caligari P.D.S., Forster B.P. *AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) with reference to salt tolerance and associated ecogeography* GENOME 1997, Vol.40 (3): 332-341;

- Pastinen T., Kurg A., Metspalu A., Peltonen L., and Syvänen A-C. *Minisequencing: A Specific Tool for DNA Analysis and Diagnostics on Oligonucleotide Arrays* GENOME RESEARCH 1997, Vol. 7: 606-614;
- Pépin L. & Nguyen T.C. *Blood groups and protein polymorphisms in five goat breeds (Capra Hircus)* ANIMAL GENETICS 1994, Vol. 25: 333-336;
- Pereira F., Pereira L., Van Asch B., Bradley D.G., Amorim A. *The mtDNA catalogue of all Portuguese autochthonous goat (Capra hircus) breeds: high diversity of female lineages at the western fringe of European distribution* MOLECULAR ECOLOGY 2005, Vol. 14: 2313-2318;
- Pringle H. *Reading the signs of ancient animal domestication* SCIENCE 1998 November 20, Vol. 282 (5393): 1448;
- Pritchard J.K., Stephens M. Donnelly P. *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data* GENETICS 2000 June, Vol. 155: 945-959;
- Purvis A., Hector A. *Getting the measure of biodiversity* NATURE 2000 May 11, Vol. 405: 212-219;
- Questiau S., Eybert M.C., Taberlet P. *AFLP markers reveal extra-pair parentage in a bird species: the blue throat (Luscinia svecica)* MOLECULAR ECOLOGY 1999, Vol. 8: 1331-1339;
- Ramunno L., Rando A., Di Gregorio P., Capogreco B., Masina P. *Indagine di popolazione sui geni a effetto maggiore sul contenuto di caseina as1 e b nel latte di capra* ZOOTECNICA E NUTRIZIONE ANIMALE 1994, Vol. 20: 107-111;
- Rebbeck T.R., Spitz M., Wu X. *Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies* NATURE REVIEW GENETICS 2004 August, Vol. 5: 589-597;
- Redford K.H., Richter B.D. *Conservation of biodiversity in a world of use* CONSERVATION BIOLOGY 1999 December, Vol. 13(6): 1246-1256;

- Reynolds J., Weir B.S., Cockerham C. *Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance* GENETICS SOCIETY OF AMERICA 1983, Vol. 105: 767-779;
- Richards R.I. & Sutherland G.R. *Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease* CELL 1992 September 4, Vol. 70: 709-712;
- Rodero E., Rodero A., De La Haba M.R. *Genetic study of Andalusia's ovine and caprine breeds* JOURNAL OF ANIMAL BREEDING AND GENETICS 1997, Vol. 114: 143-161;
- Ross, P., Hall, L., Haff, L.A. *Quantitative Approach to Single-Nucleotide Polymorphis Analysis Using MALDI-TOF Mass Spectrometry* BIOTECHNIQUES, 29, 620-629;
- Ryder O.A. *Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies* TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION 1986, Vol. 1:9-10;
- Sabeti P.C., Reich D.E., Higgins J.M., Levine H.Z.P., Richter D.J., Schaffner S.F., Gabriel S.B., Platko J.V., Patterson N.J., McDonald G.J., Ackerman H.C., Cambell S.J., Altshuler D., Cooperk R., Kwiatkowski D., Ward R., Lander E.S. *Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure* NATURE 2002 October 24, Vol. 419: 832-837;
- Saitbekova N., Gaillard C., Obexer-Ruff G., Dolf G. *Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis* ANIMAL GENETICS 1999, Vol. 30: 36-41;
- Saitbekova N., Gaillard C., Obexer-Ruff G., Dolf G. *Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis* ANIMAL GENETICS 1999, Vol. 30: 36-41;
- Saitou N & Nei M. *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees* MOLECULAR BIOLOGY & EVOLUTION 1987 July, Vol 4(4):406-25;

- Salvelkoul P.H.M., Aarts H.J.M., de Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.K.W., Schouls L., Lenstra J.A. *Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of the art* JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 1999 October, Vol. 37(10): 3083-3091;
- San Cristobal M., Renand G., Amigues Y., Boscher M-Y., Levéziel H., Bibé B. *Traçabilité individuelle des viandes bovines à l'aide de marqueurs génétiques* INRA PROD. ANIM. 2000, Vol. 13: 246-269;
- Saunders G.C., Dukes J., Parkes H.C., Cornett J.H. *Interlaboratory study on thermal cycler performance in controlled PCR and random amplified polymorphic DNA analyses* CLINICAL CHEMISTRY 2001 January, Vol. 47(1):47-55;
- Schierwater B. & Ender A. *Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products* NUCLEIC ACID RESEARCH 1993, Vol. 21: 4647-4648;
- Schlötterer C. *Hitchhiking mapping – functional genomics from the population genetics perspective* TRENDS IN GENETICS 2003 January, Vol. 19(1): 32-38;
- Schlotterer C. *The evolution of molecular markers-just a matter of fashion?* NATURE GENETICS REVIEW 2004 January, Vol. 5: 63-69;
- Shen R., Fan J-B., Campbell D., Chang W., Chen J., Doucet D., Yeakley J., Bibikova M., Wickham Garcia E., McBride C., Steemers F., Garcia F., Kermani B. G., Gunderson K., Oliphant A. *High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays* MUTATION RESEARCH 2005, Vol. 573: 70–82;
- Simianer H. *Decision making in livestock conservation* ECOLOGICAL ECONOMICS 2005, Vol. 53: 559-572;
- Simianer H. *Noah's Dilemma: Which Breeds to Take Aboard the Arc?* 7TH WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION. MONTPELLIER, FRANCE, 19-23 August, 2002;

- Simianer H. *Using expected allele number as objective function to design between and within breed conservation of farm animal biodiversity* JOURNAL OF ANIMAL BREEDING GENETICS 2005, Vol. 122: 177-187;
- Simianer H., Marti S., Gibson J., Hanotte O., Rege J.E.O. *An Approach to the Optimal Allocation of Conservation Funds to Minimize Loss of Genetic Diversity between Livestock Breeds.* ECOLOGICAL ECONOMICS 2003, Vol. 45: 377-392;
- Sivasundar A. & Hey J. *Population genetics of Caenorhabditis elegans: the paradox of low polymorphism in a widespread species* GENETICS 2003, Vol. 163: 147-157;
- Skøt L., Sackville Hamilton N.R., Mizen S., Chorlton K.H., Thomas I.D. *Molecular genecology of temperature response in Lolium perenne: 2. association of AFLP markers with ecogeography* MOLECULAR ECOLOGY 2002, Vol. 11: 1865-1876;
- Slatkin M. *Estimating levels of gene flow in natural populations* GENETICS 1981, Vol. 99: 323;
- Stumpf M.P.H., Goldstein D.B. *Genealogical and evolutionary inference with the human Y chromosome* SCIENCE 2001 March 2, Vol. 291: 1738-1742;
- Subudhi PK, Parami NP, Harrison SA, Materne MD, Murphy JP, Nash D. *An AFLP-based survey of genetic diversity among accessions of sea oats (Uniola paniculata, Poaceae) from the southeastern Atlantic and Gulf coast states of the United States* THEOR APPL GENET. 2005 September, Vol. 30:1-10;
- Sultana S., Mannen H., Tsuji S. *Mitochondrial DNA diversità of Pakistani goats* ANIMAL GENETICS 2003, Vol. 34: 417-421;
- Tautz D. *Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers* NUCLEIC ACID RESEARCH 1989, Vol. 17: 6463-6471;
- Thaon d'Arnoldi C, Foulley J.L., Ollivier L. *An overview of the Weitzman approach to diversity.* GENETICS, SELECTION AND EVOLUTION 1998, Vol. 30: 149-161;

- Toomajian C., Ajioka R.S., Jorde L.B., Kushner J.P., Kreitman M. *A method for detecting recent selection in the human genome from allele age estimates* GENETICS 2003 September, Vol. 165: 287-297;
- Twyman R.M. & Primrose S.B. *Techniques patents for SNP genotyping* PHARMACOGENOMICS 2003, Vol. 4(1): 67-79;
- Valentini A., Ajmone-Marsan P., Cappuccio I., Tardone A. *Molecular markers and genome analysis of livestock*. PROCEEDINGS OF THE SECOND KOREA-ITALY JOINT SYMPOSIUM: APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY AND ENVIRONMENT MANAGEMENT TO IMPROVE THE QUALITY OF ANIMAL PRODUCTS Viterbo-Reggio Emilia 28/6-5/7/97, pagg. 35-45;
- Van Haeringen W.A., Den Bieman M., Gillissen G.F. Lankhorst Æ., Kuiper M. T. R., Van Zutphen L. F. M., Van Lith H. A. *Mapping of a QTL for serum HDL cholesterol in the rabbit using AFLP technology* JOURNAL OF HEREDITY 2001, Vol. 92: 322-326;
- Vekemans X., Beauwens T., Lemaire M., Roldàn-Ruiz I. *Data from AFLP markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size* MOLECULAR ECOLOGY 2002, Vol. 11: 139-151;
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen André *A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics* GENETIC SELECTION & EVOLUTION 2002, Vol. 34: 275-305;
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 1995 November 11, Vol. 23(21):4407-14;
- Vos P., Kuiper M. *DNA Markers: Protocols Application and Overviews*. J. WILEY AND SONS, INC., BOGNOR REGIS, SUSSEX, 1996;

- Weber J.L., May P.E. *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction* AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 1989 March, Vol 44(3):388-96
- Weir B.S. & Cockerham C.C. *Estimating F-statistics for the analysis of population structure* EVOLUTION 1984, Vol.38:1358-1370.
- Weitzman M.L. *The Noah's Ark Problem*. ECONOMETRICA 1998, Vol 66: 1279-1298;
- Weitzman M.L. *What to preserve? An application of diversity theory to crane conservation* QUART JOURNAL OF ECONOMY 1993, Vol. CVIII: 157-183;
- Weitzman S. *On diversity* QUARTERLY JOURNAL OF ECONOMICS 1992, Vol. 107: 363-405;
- Wieland B, Regula G, Danuser J, Wittwer M, Burnens AP, Wassenaar TM, Stark KD *Campylobacter spp. in dogs and cats in Switzerland: risk factor analysis and molecular characterization with AFLP* J VET MED B INFECT DIS VET PUBLIC HEALTH 2005 May, Vol. 52(4):183-9;
- Wilding C.S., Butlin R.K., Grahame J. *Differential gene exchange between parapatric morphs of Littorina saxatilis detected using AFLP markers* JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY 2001, Vol. 14: 611-619;
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers* NUCLEIC ACIDS RESEARCH 1990 November 25, Vol. 18(22):6531-5;
- Wilson, E. O. *The diversity of life*, 1992 CAMBRIDGE: BELKNAP PRESS;
- Wofford JK, Blunt D, Ballecer C, Prochazka M, *High-throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)*. HUMAN GENETICS 2000 November;107(5):483-7;
- Wright S. *Evolution in Mendelian populations* GENETICS 1931, Vol 16: 97-159;
- Wright S. *The genetical structure of populations* ANNALS OF EUGENICS 1951, Vol. 15: 323-354

- Z., Baker A.J., Hill G.E., Edwards S.V. *Reconciling actual and inferred population histories in the house finch (Carpodacus mexicanus) by AFLP analysis* EVOLUTION 2004, Vol. 57: 2852-2864;
- Zeder M.A., Hesse B. *The initial domestication of goats (Capra hircus) in the Zagros Mountains 10,000 years ago* SCIENCE 2000 March 24 Vol. 287: 2254-2257;
- Zhivotovsky L.A. *Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers* MOLECULAR ECOLOGY 1999, Vol. 8: 907-913;

Appendice A



CHI-ARG29

RAZZA ARGENTATA



RAZZA CAMOSCIATA



RAZZA BIONDA



CHI-GIR32

RAZZA GIRGENTANA



RAZZA OROBICA



RAZZA VALDOSTANA

Appendice B

1. Albania (dati raccolti nel 2002)

Nome locale	Capore		
Distribuzione media	Est		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	250	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine riproduttive	8800	
	Andamento delle femmine riproduttive	Riduzione	
Femmine pure accoppiate(%)	<70		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	70	60
	Peso vivo(kg)	72	46
Numero di allevamenti	<400		
Uso	latte, carne		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stabile	
	Stabulato	12 mesi	
	Nutrito	pascolo e foraggio	
Attività di conservazione	Non esistono attività		
Confronto performance	Razza standard	Saanen(Albania)	
molto maggiore in	% grasso		
uguale in:	Numerosità figliata*, intervallo figliata, aumento giornaliero, muscolatura*, magrezza della carcassa, lunghezza del periodo di accoppiamento, età della maturità sessuale		
più basso in	Produzione di latte		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	961	
	Velocità di inbreeding per generazione (derivata da N _e)	0.052%	
	Stato di minaccia:	Potenzialmente minacciata	
	Nessuna femmina è stata registrata nel libro genealogico della razza; un'alta percentuale di animali adulti sono stati esportati in Grecia.		
Nome locale	Dragobie		
Distribuzione media	nord-est		
Origine e sviluppo	Razza locale		

Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	370	
	Femmine allevate	8720	
	Andamento delle femmine allevate	Leggera riduzione	
Femmine pure accoppiate(%)	80		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	75	65
	Peso vivo(kg)	65	50
Numero di allevamenti	<400		
Uso	Latte, carne; Abilità speciali/adattamento: ben adattata alle Alpi Albanesi		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stazionario	
	Stabulato	sempre stabulato	
	Nutritimento	pascolo e foraggio	
Confronto performance	Razza standard	Alpine (Albania)	
maggiore in	% grasso, % proteine, incremento giornaliero***, muscolatura*, Numerosità figliata*		
uguale in:	magrezza della carcassa, lunghezza del periodo di accoppiamento, età della maturità sessuale		
più basso in	latte produzione, intervallo di filiazione, produzione di lana o fibra		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	1420	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.035%	
	Stato di minaccia:	non minacciata	
	Nessuna femmina è stata registrata nel libro genealogico della razza.		
Nome locale	Dukati		
Distribuzione media	Ovest		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	400	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	9700	
	Andamento delle femmine allevate	Leggero decremento	
Femmine pure accoppiate(%)	95		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	65	55
	Peso vivo(kg)	45	38
Numero di allevamenti	< 500		
Uso	Latte, carne		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stazionario	
	Stabulato	Più di 6 mesi	
	Nutritimento	Pascolo	
Attività di conservazione	Non esistono attività		

Confronto performance	Razza standard		Saanen (Albania)	
maggiore in	Numerosità figliata*			
Uguale in:	% grasso, magrezza della carcassa, lunghezza del periodo di accoppiamento,			
più basso in	% proteine, incremento giornaliero***, muscolatura**, intervallo di filiazione, età della maturità sessuale			
molto più basso in	latte produzione			
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)		1,533	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)		0.033%	
	Stato di minaccia:		Non minacciata	
	Nessuna femmina è stata registrata nel libro genealogico della razza.			
Nome locale	Has			
Distribuzione media	nord-est			
Origine e sviluppo	Razza locale			
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale		2500	
	Femmine allevate		53000	
	Andamento delle femmine allevate		stabile	
Femmine pure accoppiate(%)	80			
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	78	70	
	Peso vivo(kg)	70	55	
Uso	(1) latte (2) carne			
Condizioni tipiche di gestione	Tipo		stazionario	
	Stabulato		Sempre stabulato	
	Nutrimento		pascolo e foraggio	
Attività di conservazione	Non esistono attività			
Confronto performance	Razza standard		Saanen (Albania)	
maggiore in	incremento giornaliero***, muscolatura**			
uguale in:	% grasso, % proteine, magrezza della carcassa, Numerosità figliata*, produzione di lana o fibre			
più basso in	Lunghezza del periodo di accoppiamento, età della maturità sessuale			
molto più basso in	latte produzione			
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)		9,443	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)		0,005%	
	Stato di minaccia:		Non minacciata	

	Nessuna femmina è stata registrata nel libro genealogico della razza		
Nome locale	Ligenasi		
Distribuzione media	Est		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	350	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	9000	
	Andamento delle femmine allevate	Leggero decremento	
Femmine pure accoppiate(%)	90		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	65	60
	Peso vivo(kg)	55	43
Numero di allevamenti	< 400		
Uso	latte, carne		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Stazionaria	
	Stabulato	12 mesi	
	Nutrimento	Pascolo e foraggio	
Attività di conservazione	Non esistono attività		
Confronto performance	Razza standard	Saanen (Albania)	
maggiore in	Numerosità figliata*		
uguale in:	% grasso, magrezza della carcassa, lunghezza del periodo di accoppiamento,		
più basso in	incremento giornaliero***, muscolatura**, intervallo parto, età della maturità sessuale		
molto più basso in	latte produzione		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	1342	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0,037%	
	Stato di minaccia:	Non minacciata	
	Nessuna femmina è stata registrata nel libro genealogico della razza.		
Nome locale	Mati		
Distribuzione media	Centro, nord est		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	1200	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	32000	
	Andamento delle femmine allevate	Stabile	
Femmine pure accoppiate(%)	80		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	75	65
	Peso vivo(kg)	65	50

Numero di allevamenti	<1500		
Uso	Carne, latte		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Stabile	
	Stabulato	Sempre stabulato	
	Nutrimento	Pascolo, fieno	
Attività di conservazione	Non esistono attività		
Confronto performance	Razza standard	Saanen	
maggior in	Incremento giornaliero***, , muscolatura**, Numerosità figliata*		
uguale in:	magrezza della carcassa		
più basso in	Latte produzione		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	4585	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.011%	
	Stato di minaccia:	Non minacciata	
	Nessuna femmina è stata registrata nel libro genealogico della razza		
Nome locale	Muzhake		
Distribuzione media	sud-est, sud		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	1500	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	34000	
	Andamento delle femmine allevate	Leggero decremento	
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	65	60
	Peso vivo(kg)	50	40
Numero di allevamenti	< 800		
Uso	latte, carne		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Stazionaria	
	Stabulato	sempre stabulato	
	Nutrimento	pascolo e foraggio	
Attività di conservazione	Non esistono attività		
Confronto performance	Razza standard	Saanen (Albania)	
maggior in	% grasso		
uguale in:	% proteine, magrezza della carcassa, Numerosità figliata*, lunghezza del periodo di accoppiamento, intervallo parto, incremento giornaliero***, muscolatura**		
più basso in	latte produzione, età della maturità sessuale,		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	5686	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.009%	

	Stato di minaccia:	Non minacciata
	Nessuna femmina è stata registrata nel libro genealogico della razza	

2. Austria(dati raccolti nel 1999)

Nome locale	Pinzgauer Gebirgsziege		
Distribuzione media	Salzburg (AT32), Tirol (AT33), Kärnten (AT21), Oberösterreich (AT31), Niederösterreich (AT12)		
Origine e sviluppo	Razza locale di monta naturale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	35	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	120	
	Andamento delle femmine allevate		
Femmine pure accoppiate(%)	85		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	95	77
	Peso vivo(kg)	95	52
Uso	latte, carne;caratteristiche speciali: latte per formaggio Pingauer ; monta naturale		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stazionario	
	Stabulato	da 2 a 6 mesi	
	Nutrimento	pascolo e foraggio	
Attività di conservazione	Sconosciuta		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	104	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.48%	
	Stato di minaccia:	non minacciata	

Nome locale	Tauernschecken		
Distribuzione media	Salzburg (AT32), Tirol (AT33), Kärnten (AT21), Oberösterreich (AT31), Niederösterreich (AT12)		
Origine e sviluppo	Razza locale di monta naturale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	80	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	200	
	Andamento delle femmine allevate		
Femmine pure accoppiate(%)	90		

Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	82	73
	Peso vivo(kg)	75	60
Uso	latte, carne		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stazionaria	
	Stabulato	da 2 a 6 mesi	
	Nutrimento	pascolo e foraggio	
Attività di conservazione	sconosciuta		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	210	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.24%	
	Stato di minaccia:	non minacciata	

3. Francia (dati raccolti nell'anno 2000)

Nome locale	Poitevine		
Distribuzione media	Poitou		
Origine e sviluppo	Razza locale; introgressione dal 1970 dalla British Alpine (Regno Unito)		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale		
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	1000	
	Andamento delle femmine allevate	Stabile	
Femmine pure accoppiate(%)	80		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	80	75
	Peso vivo(kg)	72	55
Numero di allevamenti	≥10		
Uso	(1) latte (2) carne		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Stazionaria	
	Stabulato	Più di 6 mesi	
	Nutrimento	misto	
Attività di conservazione	Non esistono attività		
Confronto performance	Razza standard	Saanen (Francia)	
molto maggiore in	% grasso, % proteine		
uguale in:	muscolatura**, magrezza della carcassa, lunghezza del periodo di accoppiamento, intervallo parto, età della maturità sessuale		
più basso in	latte produzione, incremento giornaliero***, Numerosità figliata*		
Stato e causa di	Effective population size (N _e)	35	

minaccia	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	1.43%	
	Stato di minaccia:	Minimamente in pericolo	
	1000 femmine allevate ma solo 300 nel libro genealogico della razza		
	Solo il 95% femmine è utilizzato per la riproduzione della razza		
Nome locale	Pyrénéenne		
Distribuzione media	Diffusa in Francia		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale		
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	1650	
	Andamento delle femmine allevate	Aumento	
Femmine pure accoppiate(%)	85		
Uso	latte, carne		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	pascolo di monta naturale	
	Stabulato	fino a 2 mesi	
	Nutrimento		
Attività di conservazione	Non esistono attività		
Confronto performance	Razza standard	Poitou (Francia)	
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	178	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.28%	
	Stato di minaccia:	Non minacciata	
	Solo l'85% delle femmine è usato per la riproduzione. Nessuna femmina registrata nel libro genealogico della razza		
Nome locale	Rove		
Distribuzione media	Provence (FR82)		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	140	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	4000	
	Andamento delle femmine allevate	Stabile	
Femmine pure accoppiate(%)	80		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	85	72
	Peso vivo(kg)	80	55
Numero di allevamenti	≥10		
Uso	latte, carne, gestione della vegetazione. Abilità speciali/adattamento: adattamento alle condizioni tipiche del Mediterraneo		

Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Stazionaria
	Stabulato	fino a 2 mesi
	Nutrimento	pascolo e foraggio
Attività di conservazione	Esistono ancora attività	
Confronto performance	Razza standard	Alpine (Francia)
molto maggiore in	produzione di latte	
uguale in:	% proteine, incremento giornaliero***, Numerosità figliata*, lunghezza del periodo di accoppiamento, intervallo parto, età della maturità sessuale	
più basso in	% grasso	
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	410
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.12%
	Stato di minaccia:	Non minacciata
	Solo l'80% delle femmine è usato per la riproduzione.	
	Nessuna femmina registrata nel libro genealogico della razza.	

4. Germania (dati raccolti nel 2000)

Nome locale	Thüringerwald Ziege		
Distribuzione media	Thüringen (DEG), Hessen (DE7)		
Origine e sviluppo	Composta da razze locali Harzer Ziege, Rhönziege, Thüringer Landziege; importata (e introgressione dal 1970) da Toggenburg (Svizzera)		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	104	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale	104	
	Femmine allevate	386	
	Andamento delle femmine allevate	Aumento	
Femmine pure accoppiate(%)	100		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	80-85	70-75
	Peso vivo(kg)	fino a 60	fino a 60
Numero di allevamenti	≥10		
Uso	Latte, carne, gestione della vegetazione. Abilità speciali/adattamento: latte con valori dietetici; paesi collinosi; buone gambe		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stazionaria	
	Stabulato	fino a 6 mesi	
	Nutrimento	pascolo e foraggio, misto	
Attività di conservazione	Esistono ancora attività		
Confronto performance	Razza standard	German Improved Fawn	

maggiore in	Numerosità figliata*	
uguale in:	latte produzione, % grasso, muscolatura**, magrezza della carcassa, lunghezza del periodo di accoppiamento, intervallo parto, età della maturità sessuale	
più basso in	incremento giornaliero***	
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	256
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.20%
	Stato di minaccia:	Non definita
	La razza è costituita da razze straniere o importate, quindi lo stato di minaccia non è definito	
Performance data per la razza locale		

5. Grecia (dati raccolti nel 2001)

Nome locale	Skopelos		
Distribuzione media	Isole di Skopelos e Skiathos e, sulla terraferma, Magnissia, GR143		
Origine e sviluppo	Razza locale indigena		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	359	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	6251	
	Andamento delle femmine allevate	stabile	
Femmine pure accoppiate(%)	100		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	66	61
	Peso vivo(kg)	64	51
Numero di allevamenti	51		
Uso	Latte, Carne, Lana		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stazionaria	
	Stabulato	fino a 3 mesi l'anno	
	Nutimento	mista	
Attività di conservazione	6251 and 359 femmine e maschi allevati rispettivamente partecipano al programma di conservazione		
Confronto performance	Razza standard	Local Greek Goat	
molto maggiore in	latte produzione, %proteine, incremento giornaliero***, Numerosità figliata*, lunghezza del periodo di accoppiamento		
uguale in:	% grasso		
molto più basso in	Età della maturità sessuale		
Stato e causa di	Effective population size (N _e)		1358

minaccia	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N_e)	0.04
Nome locale	Vlahiki, Paggaio	
Distribuzione media	Monta naturale in altipiani in tutto il paese	
Origine e sviluppo	Razze locali originate dalla Capra Prisca	
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale	
	Femmine allevate	
	Andamento delle femmine allevate	
Femmine pure accoppiate(%)	100	
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	71 63
	Peso vivo(kg)	53 47
Numero di allevamenti	133000	
Uso	Latte, Carne, Lana	
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stazionaria
	Stabulato	da 2 a 3 mesi per anno
	Nutritimento	mista
Confronto performance	Razza standard	Locale
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N_e)	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N_e)	
	Stato di minaccia:	non minacciata

6. Italia (dati raccolti nel 2001)

Nome locale	Camosciata Delle Alpi		
Distribuzione media	Italia		
Origine e sviluppo	Razza cosmopolita		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	813	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	9998	
	Andamento delle femmine allevate	Incremento	
Femmine pure accoppiate(%)	100		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)		74
	Peso vivo(kg)	100	70

Numero di allevamenti	37		
Uso	Latte		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stazionaria	
	Stabulato	Sempre stabulato	
	Nutrimento	Mista	
Attività di conservazione	Miglioramento nella produzione di latte		
Confronto performance	Razza standard	Saanen (Italia)	
maggiore in	Latte proteine, latte grasso, peso vivo		
uguale in:	Numerosità figliata*		
più basso in	Produzione di latte		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	3007,44	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0,016%	
	Stato di minaccia:	Non minacciata	
Nome locale	Argentata dell'Etna		
Distribuzione media	Provincia di Messina, Enna e Palermo (Sicilia)		
Origine e sviluppo	Locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	37	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	2072	
	Andamento delle femmine allevate	>	
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	75	67
	Peso vivo(kg)	50	38
Numero di allevamenti	37		
Uso	Carne e latte		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stazionaria	
	Stabulato	Da 0 a 1 mese	
	Nutrimento	Pascolo	
Confronto performance	Razza standard	Sarda (Italia)	
maggiore in	% grasso, % proteine		
più basso in	Produzione di latte		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	145	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.34%	

	Stato di minaccia:	La razza è un insieme di razze locali, quindi lo stato di minaccia non è definito	
Nome locale	Capra Bionda dell’Adamello		
Distribuzione media	Provincia di Brescia		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	148	
	Maschi usati per l’inseminazione artificiale	0	
	Femmine allevate	2175	
	Andamento delle femmine allevate	Incremento	
Femmine pure accoppiate(%)	100		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)		74±3,2
	Peso vivo(kg)		54,9±6,8
Numero di allevamenti	80		
Uso	Carne, Latte		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	estensivo	
	Stabulato	5 mesi	
	Nutimento	Pastura e fieno	
Confronto performance	Razza standard	Alpine (Italia)	
maggiore in	Latte produzione, latte proteine, peso vivo		
più basso in	Latte grasso		
molto più basso in	Latte produzione, latte proteine, peso vivo		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	554,28	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0,09%	
	Stato di minaccia:	Non minacciata	
Nome locale	Capra Orobica		
Distribuzione media	Province di Lecco, Sondrio, Bergamo		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	250	
	Maschi usati per l’inseminazione artificiale	0	
	Femmine allevate	2770	
	Andamento delle femmine allevate	Stabile	
Femmine pure accoppiate(%)	100		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	90-100	70-75
	Peso vivo(kg)	80-100	55-65

Uso	Carne, Latte		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	estensiva	
	Stabulato	6 mesi	
	Nutrimento	Pascolo, fieno	
Confronto performance	Razza standard	Alpine (Italia)	
molto più basso in	Latte produzione, latte grasso, latte proteine		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	917,22	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0,054%	
	Stato di minaccia:	Non minacciata	
Nome locale	Girgentana		
Distribuzione media	Province di Agrigento e Palermo (Sicilia)		
Origine e sviluppo	Locale da markor, introgressione dal 1970 dalla Falconeri		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	80	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale	miss	
	Femmine allevate	675	
	Andamento delle femmine allevate	>	
Femmine pure accoppiate(%)	30%		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	80	70
	Peso vivo(kg)	65	50
Numero di allevamenti	13		
Uso	Latte and carne		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	stazionaria	
	Stabulato	da 2 a 6 mesi	
	Nutrimento	Pascolo e foraggio	
Confronto performance	Razza standard	Alpine (Italia)	
maggiore in	% grasso, % proteine, Numerosità figliata*, intervallo parto		
uguale in:	incremento giornaliero***, muscolatura**, età della maturità sessuale		
più basso in	Produzione di latte		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	286	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.17	
	Stato di minaccia:	Minaccia critica di estinzione	
Nome locale	Grigia Molisana		

Distribuzione media	Molise (IT72)		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale		
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	195	
	Andamento delle femmine allevate	Stabile	
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)		70
	Peso vivo(kg)		50
Numero di allevamenti	≥ 10		
Uso	(1) latte (2) carne Abilità speciali/adattamento: monta naturale		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Transumanza	
	Stabulato	Più di 6 mesi	
	Nutrito	Misto	
Attività di conservazione	Esistono ancora attività		
Confronto performance	Razza standard	Saanen (Italia)	
Maggiore in	% grasso, % proteine, muscolatura**, Numerosità figliata*		
Uguale in:	incremento giornaliero***, lunghezza del periodo di accoppiamento, intervallo parto, età della maturità sessuale		
Più basso in	latte produzione		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	19	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	2.63%	
	Stato di minaccia:	Minaccia critica	
Nome locale	SARDA		
Distribuzione media	Sardegna		
Origine e sviluppo	Locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	9050 (1)	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale	20 (2)	
	Femmine allevate	181000 (1)	
	Andamento delle femmine allevate	Riduzione	
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	76,9 (3)	70,6 (3)
	Peso vivo(kg)	67,1 (3)	49,8 (3)
Numero di allevamenti	3200 (1)		
Uso	produzione di latte, produzione di carne		

Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Semi-estensiva	
	Stabulato	Nella notte principalmente in inverno	
	Nutrimento	Pascolo	
Confronto performance	Razza standard		Maltese
maggiore in	Contenuto in grasso e proteine		
maggiore in	Rusticità		
uguale in:	Grandezza		
più basso in	Numerosità figliata*		
molto più basso in	Latte produzione		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)		34548,7
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)		0
	Stato di minaccia:		Non minacciata
Nome locale	Capra Valdostana		
Distribuzione media	Valle D’Aosta		
Origine e sviluppo	Razza locale		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale		196
	Maschi usati per l’inseminazione artificiale		0
	Femmine allevate		3809
	Andamento delle femmine allevate		
Femmine pure accoppiate(%)	100		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	79	83
	Peso vivo(kg)	90-100	70-75
Numero di allevamenti	406		
Uso	Latte, Carne		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo		Estensiva
	Stabulato		7 mesi
	Nutrimento		Mista
Attività di conservazione			
Confronto performance	Razza standard		Alpine (Italia)
Molto maggiore in	Latte grasso		
maggiore in	Latte proteine, Età della maturità sessuale		
molto più basso in	Latte produzione		

Stato e causa di minaccia	Effective population size (N_e)	745,63
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N_e)	0,067%
	Stato di minaccia:	Non minacciata

7. Portogallo (dati raccolti nel 1993)

Nome locale	Algarvia		
Distribuzione media	Algarve (PT15 - Sud del Portogallo)		
Origine e sviluppo	Locale (di Charnequeira - Portogallo)		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	500	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale		
	Femmine allevate	8000	
	Andamento delle femmine allevate	Riduzione	
Femmine pure accoppiate(%)	70		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)		
	Peso vivo(kg)	65	50
Numero di allevamenti	≥10		
Uso	Latte, carne		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo		
	Stabulato		
	Nutrimento		
Attività di conservazione	Esistono ancora attività		
Confronto performance	Razza standard	Saanen	
maggiore in	Numerosità figliata*		
più basso in	latte produzione		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	1661	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.03%	
	Stato di minaccia:	Non minacciata	
	8000 femmine allevate ma solo 3500 appartenenti al libro genealogico della razza		
	Solo il 70% delle femmine allevate sono usate per la riproduzione della razza		

8. Romania (dati raccolti nel 2002)

Nome locale	CARPATINA
Distribuzione media	In tutta la Romania

Origine e sviluppo	E' una razza naturale resistente formata dalla capra Prisca che vive nelle aree collinose e montuose dei Carpazi.		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	8,500	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale	-	
	Femmine allevate	498,891	
	Andamento delle femmine allevate	Aumento	
Femmine pure accoppiate(%)	95		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	70	53
	Peso vivo(kg)	50	46
Numero di allevamenti	> 400		
Uso	Latte, Carne, Pelo and down. Abilità speciali/adattamento: Resistenza e adattabilità alle aree tipiche della Romania. Struttura ossea molto resistente, alta attitudine alla maternità e istinto di difesa. Mobilità e agilità. Prolificità: 130 – 160.		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Stabulazione e pascolo	
	Stabulato	2 – 3 mesi	
	Nutrimento	Mista (autunno e inverno). Pascolo (primavera e estate)	
Attività di conservazione	No		
Confronto performance	Razza standard	White of Banat	
maggiore in	Spessore Down, tardiva, resistenza delle ossa		
uguale in:	Peso del corpo		
più basso in	Grandezza, spessore del pelo, pelo e lunghezza down		
molto più basso in	Prolifica, produzione di latte		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)		
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)		
	Stato di minaccia:	Razza locale non minacciata	

9. Spagna (dati raccolti nel 2003)

Nome locale	FLORIDA SEVILLANA		
Distribuzione media	Andalusia (Cordoba e Siviglia 97,2 %); Castilla La Mancha 1,1 %; Extremadura 1,6%.		
Origine e sviluppo	La razza è originaria della zona di Sevilla all'inizio del secolo scorso per incrocio di capre locali di origine pirenaica con Anglo-nubiana.		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	217	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale	0	

	Femmine allevate	3014
	Andamento delle femmine allevate	Crescita
Femmine pure accoppiate(%)	Allevamenti nel libro genealogico della razza 100%	
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	NA 70
	Peso vivo(kg)	NA 51
Numero di allevamenti	16	
Uso	Latte	
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Stazionaria
	Stabulato	12
	Nutrimento	Foraggio e concentrati
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N_e)	809.7
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N_e)	0.00061
Nome locale	Cabra Guadarrameña, del Moncayo, del Sistema Central	
Distribuzione media	Sistema Central	
Origine e sviluppo	Fa parte del tronco pirenaico, incrociata con la Cabra de Angora nei tempi di Carlo III	
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	200
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale	8
	Femmine allevate	9784
	Andamento delle femmine allevate	Crescita
Femmine pure accoppiate(%)	100%	
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	81 74
	Peso vivo(kg)	72 54
Numero di allevamenti	36	
Uso	latte	
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Stazionaria
	Stabulato	0
	Nutrimento	Foraggio e concentrati
Attività di conservazione	Controllo all'allevamento, inseminazione artificiale Marchi su formaggi e carne	
0	Effective population size (N_e)	814.6
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N_e)	0.0061
Nome locale	Costeña	
Distribuzione media	Málaga (70%), il restante 30% in Andalusia, a Caceres, Badajoz, Avila e in allevamenti isolati del Portogallo	

Origine e sviluppo	Unione del tronco pirenaico (capra pirenaica) con quello africano (cabra maltese). Ha influito su molte razze spagnole		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	10.000 (1.000 nella breed society)	
	Maschi usati per l’inseminazione artificiale	10	
	Femmine allevate	200.000 (20.000 nella breed society)	
	Andamento delle femmine allevate	Crescita-Stabile	
Femmine pure accoppiate(%)	80% circa		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	65-78	55-70
	Peso vivo(kg)	60-75	45-60
N° di allevamenti	Circa 2.000 (60 in the breed society)		
Uso	Latte (1), Carne (2)		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Stazionaria	
	Stabulato	10% Stabulati, 90% Semiestensivi	
	Nutrimento	Foraggio: Granaglie, Concentrati, Unifeed	
Attività di conservazione	Nessun tipo di conservazione. Schema di selezione della razza dal 1999 (controllo delle genealogie, controllo del latte, e inseminazione artificiale –dal 2001).		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)		3845.7
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato N _e)		0.0001
Nome locale	Montejaqueña		
Distribuzione media	73% Cádiz, 22% Málaga, 45 Sevilla		
Origine e sviluppo	Tronco aegagrus, prisca e nubiano		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale		1360
	Maschi usati per l’inseminazione artificiale		0
	Femmine allevate		6800
	Andamento delle femmine allevate		Stabile
Femmine pure accoppiate(%)	90%		
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	89.66, (99.0 di 4 anni)	74.75 (81.66 di 6 anni)
	Peso vivo(kg)	70-90	50-60
Numero di allevamenti	61		
Uso	latte		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Stazionaria	
	Stabulato	0	

	Nutrimento	Foraggio, cereali e concentrati	
Attività di conservazione	Standardizzazione fenotipica, Miglioramento genetico		
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	4533.3.	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato N _e)	0.00	
Nome locale	Castellana, Montes de Toledo		
Distribuzione media	Caceres (75%), Avila (15%), Toledo (10%)		
Origine e sviluppo	Alpina		
Numero di animali riproduttivi	Maschi usati per la monta naturale	145 (nella breed society)	
	Maschi usati per l'inseminazione artificiale	0	
	Femmine allevate	4700 (nella breed society)	
	Andamento delle femmine allevate	Decremento	
Femmine pure accoppiate(%)			
Adulto standard (maschio/femmina)	Altezza dal garrese(cm)	76	68
	Peso vivo(kg)	65	45
N° allevamenti	28 (in the breed society)		
Uso	Carne-latte		
Condizioni tipiche di gestione	Tipo	Sedentaria e transumanza	
	Stabulato	0	
	Nutrimento	Foraggio e granaglie	
Stato e causa di minaccia	Effective population size (N _e)	562.6	
	Velocità di inbreeding per generazione(derivato da N _e)	0.0008	

* numero medio di agnellini nati vivi per femmina partoriente

** rapporto tra il peso della carne e il peso della carcassa

*** incremento medio giornaliero dalla nascita allo svezzamento